



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2015

**Tiago Manuel dos
Santos Henriques**

**Efeito da disponibilidade de oxigénio na produção
de bioetanol por *Scheffersomyces stipitis***



**Tiago Manuel dos
Santos Henriques**

**Efeito da disponibilidade de oxigénio na produção
de bioetanol por *Scheffersomyces stipitis***

**Oxygen availability effect in the bioethanol
production by *Scheffersomyces stipitis***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Ramo de Biotecnologia Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto CICECO – Aveiro Institute of Materials (Ref. FCTUID/CTM/50011/2013), financiado por fundos nacionais através da FCT/MEC e quando apropriado co-financiado por fundos FEDER sob o acordo de parceria PT2020.

Dedico este trabalho aos meus avós.

O Júri

Presidente

Prof. Doutor José António Teixeira Lopes da Silva

Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Portugal.

Prof. Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Portugal.

Prof. Doutor César Simões da Fonseca

Professor associado do Departamento de Química e Biociências da Universidade de Aalborg, Dinamarca.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Ana Xavier pela sua orientação científica, pela sua amizade, pela sua inteira disponibilidade e por todo o seu apoio ao longo de todo este trabalho.

Agradeço à Professora Luísa Serafim pela sua orientação científica e por todo o seu apoio ao longo de todas as etapas deste trabalho.

Agradeço à Doutora Susana Pereira por toda a sua ajuda e apoio no trabalho experimental, mas acima de todo pela sua amizade e pela sua inteira disponibilidade.

Agradeço a todos os meus colegas do LEB – Laboratório de Engenharia Biotecnológica pelo seu companheirismo e por todos os momentos de boa disposição.

Agradeço à Raquel Fernandes, ao Lucas França, à Cátia Almeida e à Catarina Rangel por toda a sua amizade e por todos os bons momentos passados juntos.

Agradeço à minha namorada Raquel Fernandes por todo o seu apoio, por toda a sua ajuda e, acima de tudo, por ter estado sempre a meu lado nos bons e nos maus momentos.

Agradeço à minha irmã Andreia Henriques por todas as suas palavras de incentivo ao longo deste trabalho.

Por fim, agradeço de forma muito especial aos meus pais pelo seu apoio incondicional, por todo o seu carinho, por todo o seu incentivo, e por estarem sempre a meu lado em todos os momentos.

Palavras-chave

Bioetanol, Licor de cozimento ao sulfito ácido de árvores folhosas (HSSL), *Scheffersomyces stipitis*, Oxigénio, Tensão de oxigénio dissolvido, Arejamento

Resumo

O bioetanol constitui uma alternativa renovável aos combustíveis fósseis. Contudo, o bioetanol de primeira geração, produzido a partir de matérias-primas alimentares, desencadeou sérios problemas económicos e sociais, pelo que é fundamental encontrar estratégias que permitam a viabilidade comercial do bioetanol de segunda geração, produzido a partir de matérias-primas lenho-celulósicas. O licor de cozimento ao sulfito ácido de árvores folhosas (HSSL) é um subproduto da indústria papelreira que, devido ao seu elevado conteúdo em açúcares, pode ser utilizado como substrato para a produção de bioetanol de segunda geração. No entanto, a maior fração dos açúcares do HSSL é composta por pentoses. Por isso, a fermentação do HSSL é realizada pela levedura *Scheffersomyces stipitis*, pois esta é capaz de fermentar tanto as hexoses como as pentoses. Todavia, a *S. stipitis* só produz etanol sob condições microaerófilas, pelo que o maior desafio da produção de bioetanol por *S. stipitis* reside no estabelecimento das condições ótimas de arejamento. Este trabalho teve assim por objetivo estabelecer uma estratégia de arejamento que permita a eficiente produção de bioetanol a partir de HSSL por *S. stipitis* C4, a qual é uma estirpe adaptada a este substrato. Deste modo, foram realizados ensaios em Erlenmeyer, de modo a caracterizar o crescimento da *S. stipitis* C4, e ensaios em biorreator, com vista a estudar a produção de etanol por *S. stipitis* C4 em duas estratégias de arejamento diferentes. Na primeira estratégia foi usado apenas um único estágio de arejamento, com controlo da tensão de oxigénio dissolvido, DOT (%), e na segunda estratégia foram usados dois estágios de arejamento, com controlo da DOT no primeiro estágio e com restrição de oxigénio no segundo estágio. Nos ensaios em Erlenmeyer com HSSL o crescimento da *S. stipitis* C4 foi completamente inibido. Por sua vez, nos ensaios em biorreator com um único estágio de arejamento o controlo da DOT não permitiu a produção de etanol. No entanto, nos ensaios com dois estágios de arejamento em meio sintético foi possível produzir etanol de forma eficiente. Nesta estratégia, a utilização de um maior valor de DOT no primeiro estágio de arejamento permitiu aumentar a taxa específica de crescimento máxima e o rendimento em biomassa do primeiro estágio. Para além disso, a utilização de um maior valor de DOT no primeiro estágio também permitiu aumentar a produtividade em etanol durante o segundo estágio de arejamento. Por sua vez, no segundo estágio de arejamento verificou-se que a restrição de oxigénio evitou a reassimilação de etanol pela *S. stipitis* C4. Deste modo, os melhores resultados para a produção de etanol foram obtidos com controlo da DOT a 50% durante o primeiro estágio e com $0 \text{ mL}_{\text{Ar}} \cdot \text{min}^{-1}$ e 250 rpm durante o segundo estágio de arejamento. A aplicação desta estratégia de arejamento a 60% HSSL/40% meio sintético permitiu obter, no primeiro estágio de arejamento, uma taxa específica de crescimento máxima de $0,17 \text{ h}^{-1}$, o que demonstra que a elevada disponibilidade de oxigénio durante o primeiro estágio aumenta a tolerância da *S. stipitis* C4 aos inibidores. Para além disso, a taxa volumétrica de produção de etanol e o rendimento em etanol de toda a fermentação foi de respetivamente de $0,03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $0,38 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. Assim, a elevada eficiência de conversão dos açúcares em etanol (74,4%) demonstra que a fermentação com dois estágios de arejamento constitui uma estratégia promissora para a produção de bioetanol de segunda geração a partir de HSSL.

Keywords

Bioethanol, Hardwood Spent Sulphite Liquor (HSSL), *Scheffersomyces stipitis*, Oxygen, Dissolved oxygen tension, Aeration

Abstract

Bioethanol is a renewable alternative to fossil fuels. However, the first generation bioethanol, produced from food feedstocks, triggered serious economic and social problems, therefore it is essential to find strategies to enable the commercial viability of second generation bioethanol, produced from lignocellulosic feedstocks. Hardwood spent sulfite liquor (HSSL) is a by-product from paper industry that can be used as substrate for second generation bioethanol production, owing to its high sugars content. However, pentoses are the largest fraction of HSSL sugars. Therefore, the fermentation of HSSL is performed by *Scheffersomyces stipitis*, since this yeast is able to ferment both hexoses and pentoses. Nevertheless, *S. stipitis* only produces ethanol under microaerophilic conditions, so the establishment of optimal aeration conditions is the main challenge for ethanol production by *S. stipitis*. Thus, this work aimed to establish an aeration strategy that allows for the efficient bioethanol production from HSSL by *S. stipitis* C4, which is an adapted strain to this substrate. In this way, experiments were carried out in Erlenmeyer, in order to characterize *S. stipitis* C4 growth, and in bioreactor, in order to study the ethanol production by *S. stipitis* C4 in two different aeration strategies. In the first strategy was used just one aeration stage, with dissolved oxygen tension (DOT, %) control, and in the second strategy were used two aeration stages, with DOT control in the first stage and with oxygen restriction in the second stage. In the Erlenmeyer experiments, the *S. stipitis* C4 growth was completely inhibited by HSSL. Regarding to the bioreactor experiments, the DOT control did not allow for an ethanol production in one stage aeration strategy. However, efficient ethanol production was possible in two stage aeration strategy with synthetic medium. In this strategy, the maximum specific growth rate and the biomass yield increased with the use of a higher DOT value in the first aeration stage. In addition, the ethanol productivity during second aeration stage also increased with the use of a higher DOT value in the first aeration stage. In turn, the oxygen restriction in second aeration stage avoided the ethanol reassimilation by *S. stipitis* C4. Thus, the best results for ethanol production were obtained with DOT control to 50% during the first aeration stage and with 0 mL_{Air}.min⁻¹ e 250 rpm during the second aeration stage. The application of this aeration strategy to 60% HSSL/40% synthetic medium allowed to reach a maximum specific growth rate of 0.17 h⁻¹ in the first aeration stage, which demonstrates the increases of *S. stipitis* C4 tolerance to inhibitors by the high oxygen availability. Furthermore, the whole fermentation ethanol volumetric production rate and ethanol yield was 0.03 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0.38 g.g⁻¹, respectively. Thus, the high conversion efficiency of sugar in ethanol (74.4%) demonstrates the two stage aeration fermentation as a promising strategy for second generation bioethanol production from HSSL.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Contexto geral	1
1.2. Objetivo	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Transferência de massa de oxigénio	5
2.1.1 Fatores que influenciam a transferência de oxigénio	5
2.1.2 Fatores que influenciam o consumo de oxigénio	9
2.2. Bioetanol.....	10
2.2.1 Bioetanol de segunda geração	12
2.2.1.1 Licor de cozimento ao sulfito ácido (SSL).....	17
2.3. <i>Scheffersomyces stipitis</i>	20
2.3.1 Consumo de açúcares	20
2.3.2 Metabolismo da xilose.....	21
2.3.3 Tolerância aos inibidores.....	22
2.3.3.1 Adaptação da <i>S. stipitis</i> aos inibidores	24
2.3.4 Efeito da disponibilidade de oxigénio na produção de etanol	25
2.3.4.1 Reassimilação de etanol.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. HSSL	31
3.2. Microrganismo	31
3.3. Meios de cultura	32
3.4. Fermentações	32
3.4.1 Pré-inóculos e inóculos.....	32
3.4.2 Ensaio em Erlenmeyer	33
3.4.3 Ensaio em biorreator	33
3.5. Esterilização e assepsia.....	34
3.6. Métodos analíticos.....	35
3.6.1 Quantificação da biomassa	35
3.6.2 pH	35
3.6.3 Quantificação da glucose, xilose, ácido acético, xilitol e etanol	35

3.7. Cálculos	36
3.7.1 Coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio (K_La).....	36
3.7.2 Parâmetros cinéticos e estequiométricos	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Ensaios em Erlenmeyer	39
4.2. Ensaios em biorreator	43
4.2.1 Ensaios com um único estágio de arejamento	43
4.2.2 Ensaios com dois estágios de arejamento.....	47
4.2.2.1 Impacto do aumento da disponibilidade de oxigénio do primeiro estágio de arejamento	48
4.2.2.2 Impacto do aumento da disponibilidade de oxigénio do segundo estágio de arejamento	52
4.2.2.3 Melhor ensaio com dois estágios de arejamento considerando toda a fermentação	57
4.2.3 Ensaio com dois estágios de arejamento utilizando HSSL.....	59
5. CONCLUSÃO.....	65
6. TRABALHO FUTURO	67
BIBLIOGRAFIA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Emissão de gases de efeito de estufa por bioetanol produzido a partir de diferentes matérias-primas em comparação com a gasolina (adaptado de (38)).	12
Figura 2.2 – Estratégias de produção de bioetanol de segunda geração pela via bioquímica.	16
Figura 2.3 – Processo de cozimento ao sulfito ácido da biomassa lenho-celulósica (adaptado de (6)).	18
Figura 2.4 – Metabolismo da xilose em <i>S. stipitis</i> (adaptado de (6)).	21
Figura 2.5 – Conversão do piruvato em <i>S. stipitis</i> sob condições aeróbias e sob limitação de oxigénio.	26
Figura 4.1 – Ensaio em Erlenmeyer com meio sintético.	40
Figura 4.2 – Ensaio em Erlenmeyer com HSSL.	42
Figura 4.3 – Ensaio em Erlenmeyer com 60% HSSL/40% meio sintético (v/v).	42
Figura 4.4 – Ensaio em meio sintético com um único estágio de arejamento com controlo da DOT a 1% ao longo de toda a fermentação.	44
Figura 4.5 – Ensaio em meio sintético com um único estágio de arejamento com controlo da DOT a 2,5% ao longo de toda a fermentação.	45
Figura 4.6 – Ensaio em meio sintético com um único estágio de arejamento com controlo da DOT a 5% ao longo de toda a fermentação.	45
Figura 4.7 – Ensaio em meio sintético com um único estágio de arejamento com controlo da DOT a 50% ao longo de toda a fermentação.	45
Figura 4.8 – Ajuste do modelo cinético de Monod aos dados experimentais de μ_{max} versus DOT com recurso ao <i>software</i> GraphPad Prism [®] 5. O valor de μ_{max} para a DOT de 25% foi obtido do ensaio em meio sintético com dois estágios de arejamento: DOT 25% - 0 mL _{Ar} ·min ⁻¹ e 250 rpm (Tabela 4.3).	47

Figura 4.9 – Ensaio em meio sintético com DOT 5% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.	50
Figura 4.10 – Ensaio em meio sintético com DOT 25% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.	50
Figura 4.11 – Ensaio em meio sintético com DOT 50% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.	50
Figura 4.12 – Ensaio em meio sintético com DOT 50% - 50 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 150 rpm. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.	54
Figura 4.13 – Ensaio em meio sintético com DOT 50% - DOT 1%. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.....	54
Figura 4.14 – Ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento. ...	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Desempenho de estirpes selvagens e adaptadas de <i>S. stipitis</i> na fermentação de diferentes substratos.....	25
Tabela 2.2 – Condições de arejamento ótimas para a produção de etanol por <i>S. stipitis</i>	27
Tabela 3.1 – Condições de arejamento dos ensaios em biorreator com meio sintético e com 60% HSSL/40% meio sintético (v/v).	34
Tabela 4.1 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos do ensaio em Erlenmeyer com meio sintético.....	41
Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos dos ensaios em meio sintético com um único estágio de arejamento.	46
Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos de cada estágio dos ensaios em meio sintético com dois estágios de arejamento, em que se aumentou a disponibilidade de oxigénio do primeiro estágio e se manteve a mesma disponibilidade de oxigénio do segundo estágio.	51
Tabela 4.4 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos de cada estágio dos ensaios em meio sintético com dois estágios de arejamento, em que se manteve a mesma disponibilidade de oxigénio do primeiro estágio e se aumentou a disponibilidade de oxigénio do segundo estágio.....	55
Tabela 4.5 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos dos ensaios em meio sintético com dois estágios de arejamento considerando toda a fermentação.	57
Tabela 4.6 – Comparação dos resultados do ensaio DOT 50% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm com os resultados obtidos na literatura para fermentações com um único estágio de arejamento.	58
Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos de cada estágio de arejamento do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm.	60

Tabela 4.8 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm considerando toda a fermentação.	63
--	----

ABREVIATURAS

<i>a</i>	Área específica (m^{-1})
ADH	Álcool desidrogenase
ADP	Adenosina difosfato
AFEX	Explosão de amónia
ATP	Adenosina trifosfato
[Biomassa]_{max}	Concentração máxima de biomassa (g.L^{-1})
CBP	Bioprocessamento consolidado
CEPI	<i>Confederation of European Paper Industries</i>
C_{O_2}	Concentração de oxigénio dissolvido (mol.m^{-3})
$C_{O_2}^*$	Concentração de saturação de oxigénio dissolvido (mol.m^{-3})
DOT	Tensão de oxigénio dissolvido (%)
[Etanol]_{max}	Concentração máxima de etanol (g.L^{-1})
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSSL	Licor de cozimento ao sulfito ácido de árvores folhosas
IEA	<i>International Energy Agency</i>
K_L	Coefficiente de transferência de massa (m.s^{-1})
$K_L a$	Coefficiente volumétrico de transferência de massa (s^{-1})
K_{O_2}	Constante de saturação em relação ao oxigénio (%)
Lenhina-G	Lenhina guaiacil
Lenhina-GS	Lenhina guaiacil-siringil
NA	Não aplicável
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
ND	Dados não disponíveis
OTR	Taxa de transferência de oxigénio ($\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$)
OUR	Taxa de consumo de oxigénio ($\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$)
OUR_{max}	Taxa máxima de consumo de oxigénio ($\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$)
PDC	Piruvato descarboxilase
PDH	Piruvato desidrogenase
q_{O_2}	Taxa específica de consumo de oxigénio ($\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
R²	Coefficiente de correlação

ABREVIATURAS (CONTINUAÇÃO)

$r_{\text{ácido acético}}$	Taxa volumétrica de consumo de ácido acético ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
r_{etanol}	Taxa volumétrica de produção de etanol ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
r_{glucose}	Taxa volumétrica de consumo de glucose ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
r_{xilitol}	Taxa volumétrica de produção de xilitol ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
r_{xilose}	Taxa volumétrica de consumo de xilose ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
SHF	Hidrólise e fermentação separadas
SSF	Sacarificação e fermentação simultâneas
SSL	Licor de cozimento ao sulfito ácido
SSSL	Licor de cozimento ao sulfito ácido de árvores resinosas
t	Tempo (h)
X5P	Xilulose-5-fosfato
XDH	Xilitol desidrogenase
[Xilitol]_{max}	Concentração máxima de xilitol (g.L^{-1})
XK	Xiluloquinase
XR	Xilitol redutase
$Y_{\text{biomassa/substrato}}$	Rendimento em biomassa (g.g^{-1})
$Y_{\text{etanol/substrato}}$	Rendimento em etanol (g.g^{-1})
YM_{xyl}	Meio <i>Yeast Mold</i> suplementado com xilose
$Y_{\text{xilitol/xilose}}$	Rendimento em xilitol (g.g^{-1})
μ_{max}	Taxa específica de crescimento máxima (h^{-1})
μ_{MAX}	Taxa específica de crescimento máxima em função da DOT (h^{-1})

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto geral

O oxigénio é um substrato chave no crescimento, manutenção, e produção de metabolitos pelos microrganismos, pelo que a sua transferência desde a fase gasosa até às células é fundamental para o desempenho dos bioprocessos (1). Quando a taxa de transporte dos substratos para as células é superior à taxa da sua conversão bioquímica, a taxa global de conversão dos substratos depende apenas da cinética das reações metabólicas. No entanto, quando a taxa de transferência de massa é inferior à taxa de conversão metabólica, a taxa global do processo passa a ser determinada pela taxa de transporte do substrato (2). Assim, nos processos que dependem da disponibilidade de oxigénio é fundamental otimizar as condições de arejamento de modo a obter os melhores valores de produtividade e rendimento no produto de interesse.

Os problemas económicos e ambientais associados aos combustíveis fósseis a par da crescente procura energética fazem do bioetanol uma das mais importantes alternativas energéticas ao dispor da sociedade atual. Contudo, devido aos problemas sociais e económicos desencadeados pelo bioetanol de primeira geração, produzido a partir de matérias-primas alimentares, é fundamental encontrar estratégias que permitam a viabilidade comercial do bioetanol de segunda geração, produzido a partir de biomassa lenho-celulósica (3). Portugal apresenta condições favoráveis à produção de bioetanol de segunda geração, pois, para além de mais de 35% do território continental nacional ser ocupado por floresta (4), a produção de pasta de papel constitui uma das indústrias com maior impacto na economia do país, permitindo que Portugal seja inclusivamente o terceiro maior produtor de pasta dos países pertencentes à *Confederation of European Paper Industries* (CEPI) (5). Este facto reveste-se de especial importância, nomeadamente nas indústrias que empregam o processo de cozimento ao sulfito ácido, pois estas geram como subproduto o licor de cozimento ao sulfito ácido (SSL, do inglês *spent sulfite liquor*),

um subproduto com grande potencial para a produção de bioetanol devido ao seu elevado conteúdo em açúcares (6). Para além disso, o SSL é produzido em grandes quantidades, sendo gerados cerca de 8 m³ de SSL por cada tonelada de pasta de celulose produzida (7). No entanto, para que a produção de bioetanol de segunda geração seja economicamente viável é necessário que tanto as hexoses como as pentoses sejam fermentadas (8). Por esse motivo, utiliza-se a *Scheffersomyces stipitis*, por esta ser capaz de fermentar a xilose a etanol com elevado rendimento e produtividade (9). Este facto é ainda mais relevante na produção de bioetanol a partir do licor de cozimento ao sulfito ácido de árvores folhosas (HSSL, do inglês *hardwood spent sulfite liquor*), pois o principal açúcar deste subproduto é a xilose (6).

A produção de bioetanol por *S. stipitis* apresenta alguns desafios que têm de ser ultrapassados de modo a permitir que esta levedura possa ser utilizada na produção comercial de bioetanol de segunda geração. Um dos principais desafios da utilização da *S. stipitis* reside na sua baixa tolerância aos inibidores que são produzidos durante o processo de hidrólise da biomassa lenho-celulósica (10), sendo este um aspeto particularmente relevante no HSSL devido ao seu elevado conteúdo em compostos tóxicos (6). No entanto, o estabelecimento das condições ótimas de arejamento para a produção de etanol por *S. stipitis* é provavelmente o maior entrave ao sucesso desta levedura na produção de bioetanol, pois a *S. stipitis*, ao contrário da *Saccharomyces cerevisiae*, necessita de condições microaerófilas para produzir etanol (11). Por este motivo, é assim fundamental controlar a transferência de massa de oxigénio para o meio fermentativo de modo a garantir que o processo decorra nas melhores condições de arejamento para a produção de bioetanol.

1.2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma estratégia de arejamento que permita a eficiente produção de bioetanol a partir de HSSL por *S. stipitis* C4, a qual é uma estirpe adaptada a este substrato. Deste modo, primeiro caracterizou-se o crescimento da *S. stipitis* C4 em Erlenmeyer com meio sintético e com HSSL. Depois foram investigadas em biorreator com meio sintético duas estratégias de arejamento, uma primeira com apenas um único estágio de arejamento e uma segunda com dois estágios de arejamento. Na estratégia com apenas um único estágio de arejamento estudou-se o desempenho da *S. stipitis* C4

com controlo da tensão de oxigénio dissolvido, DOT (%), ao longo de toda a fermentação, e na estratégia com dois estágios de arejamento estudou-se a aplicação de um primeiro estágio com controlo da DOT e de um segundo estágio com restrição de oxigénio na produção de etanol por *S. stipitis* C4. Por fim, avaliou-se o desempenho da *S. stipitis* C4 na fermentação de 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) utilizando a melhor estratégia de arejamento estudada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Transferência de massa de oxigénio

A transferência de massa é um processo de extrema importância num biorreator, pois a taxa a que ocorre vai influenciar, e em certos casos permite mesmo controlar, a taxa de crescimento microbiano e a taxa de conversão dos substratos em produtos (12). Assim, quando a taxa de transferência de massa é inferior à taxa de conversão metabólica, a taxa global do processo passa a ser determinada pela taxa de transporte do substrato e podem-se observar dois efeitos, por um lado, a taxa de produção pode ser menor que o desejado, e por outro, a seletividade do processo pode ser alterada (13). Esta última situação tem particular pertinência em microrganismos, como a *Scheffersomyces stipitis*, em que o fluxo metabólico depende da disponibilidade de oxigénio (14).

A solubilidade do oxigénio nos meios fermentativos é bastante reduzida, não só porque a maioria destes meios são aquosos, mas também porque os sais e nutrientes dissolvidos afetam negativamente a solubilidade do oxigénio (15). Gros *et al.* (1999) desenvolveram um modelo matemático que permite estimar a solubilidade do oxigénio em meios fermentativos, e mostraram que a sua solubilidade num meio típico de *Corynebacterium glutamicum*, *Spirulina platensis*, *Escherichia coli*, e *Aspergillus niger* era, para os quatro meios, inferior à sua solubilidade em água pura (16). Por este motivo, a transferência de massa de oxigénio desde a fase gasosa até às células é, muitas das vezes, o passo que controla todo o processo fermentativo, especialmente a nível industrial onde são utilizados grandes volumes (1).

2.1.1 Fatores que influenciam a transferência de oxigénio

A transferência de oxigénio para a fase líquida é influenciada pelos microrganismos, pois verifica-se que o aumento da taxa de consumo de oxigénio, *OUR* (do inglês *oxygen uptake rate*), expressa em $\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$, tem um impacto positivo sobre a taxa

de transferência de oxigénio, *OTR* (do inglês *oxygen transfer rate*), também expressa em $\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$ (1). De facto, tipicamente no decurso de uma fermentação a concentração de oxigénio dissolvido no meio fermentativo é em grande parte determinada pelo consumo de oxigénio por parte dos microrganismos. Assim, quanto maior a diferença entre a concentração de saturação de oxigénio e a concentração de oxigénio dissolvido na fase líquida, maior é a força diretriz para a transferência de massa de oxigénio (12). Díaz-Barrera *et al.* (2014) caracterizaram a evolução da concentração de biomassa, da concentração de oxigénio dissolvido, e da *OTR*, de uma fermentação com *Azotobacter vinelandii* mantendo constante tanto a composição da corrente gasosa, como a velocidade de agitação e o caudal de ar. No início da fermentação estes autores verificaram que com o aumento da biomassa a *OTR* aumentava, pois devido ao crescimento celular o consumo de oxigénio aumenta e a concentração de oxigénio dissolvido diminui, levando a que a força diretriz para a transferência de massa aumente. Depois, quando a concentração de oxigénio dissolvido atingiu um valor nulo a cultura entrou em limitação de oxigénio. Esta segunda fase caracteriza-se pelo valor máximo de *OTR*, o qual se mantém constante enquanto a concentração de oxigénio dissolvido permanece nula. Para além disso, importa referir que durante esta fase, como não existe acumulação de oxigénio, o oxigénio transferido para a fase líquida corresponde ao oxigénio consumido pela cultura, e assim a *OTR* é igual à *OUR*. No entanto, apesar da cultura estar sob limitação de oxigénio, a biomassa continuou a aumentar até se verificar o esgotamento de um dos nutrientes essenciais. Nessa altura, com a cessação do crescimento, a concentração de oxigénio dissolvido voltou a aumentar e a *OTR* a diminuir (17).

Outro aspeto fundamental na transferência de oxigénio são as variáveis processuais do sistema, entre as quais se destaca a velocidade de agitação, o caudal de ar (18), a composição da corrente gasosa (19), e a pressão de ar (20). Para além destas, as propriedades reológicas do meio (21) e a geometria, quer do vaso reacional, como da turbina e do dispersor também influenciam determinantemente a transferência de oxigénio para a fase líquida (22). Por este motivo, o controlo da *OTR* é normalmente alcançado pela alteração destas condições.

A alteração da velocidade de agitação e do caudal de ar estão entre as técnicas mais comumente utilizadas no controlo da transferência de oxigénio (17, 18, 23-26). Com efeito, o aumento da velocidade de agitação reduz a espessura do filme de líquido

estagnado e o tamanho das bolhas de gás, o que aumenta, respetivamente, o coeficiente de transferência de massa, K_L (m.s^{-1}), e a área específica para a transferência de massa, a (m^{-1}). Deste modo, o aumento da velocidade de agitação vai traduzir-se num aumento do valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa, K_{La} (s^{-1}), e como tal da *OTR* (12). Por sua vez, o aumento do caudal de ar aumenta o volume total de bolhas de ar na fase líquida, o que se traduz numa maior área específica para a transferência de massa, a , e consequentemente num maior valor de K_{La} (20). Özbek *et al.* (2001) utilizando um reator equipado com quatro defletores e com uma turbina de Rushton de seis pás, verificaram que em água destilada o aumento da velocidade de agitação de 100 para 500 rpm, a um caudal de ar de 0,50 vvm, se traduzia num aumento do K_{La} de 8 para 316 h^{-1} , e que o aumento do caudal de ar de 0,25 para 1,50 vvm, a uma velocidade de agitação de 300 rpm, se traduzia num aumento do K_{La} de 104 para 321 h^{-1} (18). Por sua vez, Limpai boon (2013) utilizando um reator equipado com defletores e com duas turbinas de seis pás inclinadas, verificou que, num meio contendo extrato de levedura ($2,00 \text{ g.L}^{-1}$), peptona ($3,33 \text{ g.L}^{-1}$) e glucose ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$), o aumento da velocidade de agitação de 300 para 600 rpm, a um caudal de ar de 1,00 vvm, se traduzia num aumento do K_{La} de 25 para 104 h^{-1} , e que o aumento do caudal de ar de 1,00 para 1,75 vvm, a uma velocidade de agitação de 300 rpm, se traduzia num aumento do K_{La} de 25 para 36 h^{-1} (26). Para além disso, os resultados obtidos por estes autores mostram ainda que o K_{La} tem uma maior dependência da velocidade de agitação do que do caudal de ar, o que também foi observado por Puthli *et al.* (2000) (27), por Amaral *et al.* (2008) (28), por Lopes *et al.* (2013) (20), por Karimi *et al.* (2013) (29) e por Díaz-Barreda *et al.* (2014) (17).

Tanto o aumento da velocidade de agitação como do caudal de ar acarretam um elevado custo energético e podem ter um efeito nefasto sobre as células, devido ao atrito hidrodinâmico que é gerado pela excessiva turbulência (12). Converti *et al.* (1996) estudaram o efeito da velocidade de agitação sobre a viabilidade celular de uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* numa solução isotónica e observaram que quanto maior a velocidade de agitação maior a diminuição da concentração celular ao longo do tempo (30). Uma alternativa a estes métodos consiste assim no fornecimento ao biorreator de ar enriquecido em oxigénio, ou mesmo de oxigénio puro, de modo a aumentar a força diretriz da transferência de massa (19). No entanto, este método pode causar *stress* oxidativo às células, devido à formação de espécies reativas de oxigénio (12). Outra alternativa consiste

ainda no aumento da pressão de ar de modo a aumentar assim a solubilidade do oxigénio na fase líquida (20).

Uma forma de ultrapassar as desvantagens das técnicas anteriores passa pela introdução no meio de cultura de vetores de oxigénio líquidos (28, 31) ou sólidos (32, 33) para facilitar a transferência do oxigénio da bolha de gás para a fase aquosa. Os vetores líquidos facilitam a transferência através da elevada solubilidade do oxigénio numa fase imiscível (28, 31). Amaral *et al.* (2008) utilizando um reator equipado com duas turbinas de Rushton de seis pás, mostraram que, num meio contendo extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona ($6,4 \text{ g.L}^{-1}$) e glucose (20 g.L^{-1}), a adição de perfluorodecalina numa fração volumétrica de 20% permitia aumentar o K_{La} em 230% (28). Por sua vez, os vetores sólidos facilitam a transferência através da adsorção das moléculas de oxigénio da bolha de gás à sua superfície e subsequente transferência das mesmas para a fase líquida (32). Manikandan *et al.* (2012), usando um caudal de ar de 0,50 vvm e a uma velocidade de agitação de 200 rpm, mostraram que em água a presença de nanopartículas de óxido de ferro numa concentração de 0,065% (m/m) permitia aumentar o K_{La} em 63% (33).

As propriedades reológicas do meio, tais como a sua densidade, viscosidade e tensão superficial, também influenciam a transferência de oxigénio. No caso da viscosidade, o seu aumento está associado a uma diminuição da turbulência do líquido, e assim, como consequência, o tamanho das bolhas de gás aumenta e o K_{La} diminui (21). Özbek *et al.* (2001) verificaram que em soluções de glicerol o aumento da viscosidade de 0,935 para 566,04 mPa.s diminuía o K_{La} de 159 para 5 h^{-1} (18). Já no que diz respeito à tensão superficial, a sua diminuição permite, por um lado, que as bolhas geradas no dispersor sejam mais pequenas, e por outro, que a taxa de coalescência dentro do reator diminua, o que se traduz assim num aumento do K_{La} . Bi *et al.* (2001) verificaram que, a uma velocidade de agitação de 300 rpm e a um caudal de ar de 0,30 vvm, o aumento da concentração de etanol de 0 para 8 g.L^{-1} , permitia aumentar o K_{La} de 34 para 97 h^{-1} graças à diminuição da tensão superficial (34).

A geometria da turbina e do dispersor, a altura da turbina em relação ao dispersor e o número de turbinas, determinam a eficiência da potência despendida na transferência de oxigénio. Assim, quando se trabalha a elevadas velocidades de agitação a eficiência da potência despendida é tanto maior quando mais perto a turbina se encontra do dispersor, pois a turbina quebra as bolhas mais facilmente junto ao dispersor. No entanto, a baixas

velocidades de agitação, a posição da turbina tem menor impacto sobre o K_{La} , pois neste caso a principal contribuição reside na deformação das bolhas pelo fluxo de líquido. Por sua vez, o dispersor também influencia a eficiência da potência despendida, pois este determina o tamanho inicial com que as bolhas são fornecidas ao sistema. À partida, o K_{La} será tanto maior quanto mais pequenas forem as bolhas fornecidas pelo dispersor. Contudo, verifica-se que as bolhas mais pequenas são mais dificilmente quebradas pelas turbinas, pelo que, a eficiência da potência despendida é tanto maior quanto maior o tamanho das bolhas fornecidas. Todavia, nos casos em que o tamanho das bolhas fornecidas é pequeno, o aumento da altura da turbina em relação ao dispersor compensa a falta de eficiência na quebra das bolhas, devido ao aumento do arejamento superficial em resultado da maior turbulência da superfície do líquido (22). Karimi *et al.* (2013) compararam a turbina de Rushton com a turbina de duas e de quatro pás inclinadas, e verificaram que os melhores valores de K_{La} eram obtidos com a turbina de Rushton, pois esta era a turbina mais eficiente na quebra das bolhas (29). Em outro estudo, Puthli *et al.* (2005) verificaram que a utilização de um sistema com três turbinas, uma de Rushton e duas de pás inclinadas, permitia, relativamente ao sistema com apenas uma turbina e ao sistema com uma turbina de Rushton e uma de pás inclinadas, um melhor K_{La} a potências despendidas mais baixas, pois as turbinas de pás inclinadas geram um fluxo descendente que em combinação com o fluxo radial da turbina de Rushton permite uma maior fração de gás dentro da fase líquida (27). Outro aspeto decisivo nas condições hidrodinâmicas do sistema reside na utilização ou não de defletores, pois estas estruturas ao aumentarem a turbulência dentro do reator, reduzem o tamanho das bolhas, e aumentam assim a área interfacial (35).

2.1.2 Fatores que influenciam o consumo de oxigénio

A OUR é influenciada essencialmente pela concentração celular e pelo estado metabólico dos microrganismos (1). García-Ochoa *et al.* (2000) estudaram o impacto da biomassa sobre a OUR , a concentração de oxigénio dissolvido e a taxa específica de consumo de oxigénio, q_{O_2} ($\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), no decurso de uma fermentação com *Xanthomonas campestris* (36). Estes autores verificaram que a OUR aumentava durante a fase exponencial, em resultado do aumento da taxa de crescimento e da atividade metabólica, e que diminuía com a entrada da cultura em fase estacionária, devido à redução da atividade metabólica das células. Consequentemente, a concentração de oxigénio dissolvido

diminuiu durante a fase exponencial, em resultado da maior procura por oxigénio, e aumentou com a entrada da cultura em fase estacionária, devido à diminuição dessa procura. Por sua vez, a q_{O_2} aumentou durante a fase lag e o início da fase exponencial e diminuiu com a aproximação do fim da fase exponencial. O valor mínimo da q_{O_2} corresponde ao consumo de oxigénio para manutenção, pelo que este valor apenas foi alcançado na fase estacionária, quando a biomassa atingiu o seu valor máximo (1, 36).

A concentração de oxigénio dissolvido no meio de cultura resulta do balanço entre o oxigénio que é transferido para o meio e o oxigénio que é consumido pelas células, sendo a quantidade de oxigénio disponível determinante para o correto desempenho do bioprocessos (1). Deste modo, a *OUR* também pode ser influenciada pelas condições hidrodinâmicas do sistema, pois sob limitação do transporte de oxigénio a *OUR* é severamente afetada (1). Assim, quando a *OTR* é menor que a OUR_{max} , ou seja, quando a capacidade de transferir oxigénio para o meio é menor que a capacidade máxima de consumo das células, o oxigénio dissolvido é o fator limitante do crescimento. Por este motivo, quando se pretende um crescimento ótimo da cultura deve garantir-se que a *OTR* compensa a *OUR* (12). Contudo, em certos bioprocessos, como na produção de bioetanol por *S. stipitis*, o produto de interesse só é produzido em limitação de oxigénio, pelo que nestes casos deve garantir-se a limitação da *OUR* pela *OTR*. Deste modo, é fundamental que as condições de transferência de massa de oxigénio durante a produção de bioetanol por *S. stipitis* sejam otimizadas.

2.2. Bioetanol

Em 2013, segundo dados da *International Energy Agency* (IEA), 81,4% de toda a energia produzida a nível mundial proveio de combustíveis fósseis, sendo o setor dos transportes responsável pelo consumo de 63,8% de todo o petróleo produzido (37). Contudo, devido à cada vez maior procura energética, à extração cada vez mais dispendiosa dos combustíveis fósseis e à elevada quantidade de gases de efeito de estufa emitidos pela utilização destes combustíveis, tornou-se premente encontrar fontes de energia alternativas. Os biocombustíveis constituem assim uma alternativa aos combustíveis fósseis com um grande potencial, pois são produzidos a partir de matérias-primas renováveis e permitem que o CO_2 libertado na sua combustão seja reciclado através de vias fotossintéticas (3).

O bioetanol é, a nível mundial, o biocombustível mais utilizado no setor dos transportes, podendo ser misturado com a gasolina em diferentes proporções. A mistura conhecida como E10 possui 10% de bioetanol e 90% de gasolina, e não requer qualquer modificação dos motores. No entanto, para misturas superiores, como a E85, com 85% de bioetanol, já é necessária a modificação dos motores (38). A possibilidade de misturar o bioetanol com a gasolina assume uma particular relevância atendendo à diretiva europeia (2009/28/CE) que estabelece a meta de que até 2020 todos os combustíveis automóveis sejam compostos por pelo menos 10% em biocombustível (39). Para além disso, relativamente à gasolina o bioetanol possui ainda um maior índice de octanas (108), o que permite um melhor rácio de compressão e uma menor emissão de gases de efeito de estufa. Deste modo, a mistura do bioetanol com a gasolina reduz o consumo de petróleo e a emissão de gases de efeito de estufa (38).

Os EUA e o Brasil são os maiores produtores de bioetanol, com uma cota da produção mundial de 58% e 25%, respetivamente. Por sua vez, a Europa apenas produz 6% do bioetanol mundial (40). O bioetanol nos EUA é produzido essencialmente a partir do amido de milho, enquanto no Brasil é produzido principalmente a partir de cana-de-açúcar e na Europa maioritariamente de trigo e cevada (38). Este bioetanol produzido a partir de matérias-primas alimentares é designado de bioetanol de primeira geração (41). No caso das matérias-primas amiláceas, como o milho, o trigo ou a cevada, a produção de bioetanol baseia-se na hidrólise enzimática do amido e na fermentação da glucose obtida, normalmente, com a levedura *S. cerevisiae* (42-44). Já no caso das matérias-primas contendo sacarose, como a cana-de-açúcar ou a beterraba sacarina, a produção de bioetanol é feita diretamente através da fermentação dos sumos destas matérias-primas (45, 46).

A utilização de matérias-primas alimentares para a produção de bioetanol, levou ao aumento do preço dos produtos alimentares nos mercados internacionais, desencadeando sérios problemas sociais. Por este motivo, atualmente uma das matérias-primas em que mais se aposta é a biomassa lenho-celulósica, produzindo-se o chamado bioetanol de segunda geração (3). Para além de não utilizar matérias-primas alimentares, o bioetanol de segunda geração permite ainda uma maior redução das emissões de gases de efeito de estufa, quando comparado com o bioetanol proveniente da maioria das fontes alimentares (Figura 2.1) (38). Assim, atendendo a estas vantagens, ao baixo custo e à ampla disponibilidade da biomassa lenho-celulósica (38), espera-se que no futuro o bioetanol de

segunda geração substitua progressivamente o bioetanol de primeira geração (47). Neste âmbito, a Comissão Europeia publicou em 2012 uma retificação à diretiva (2009/29/EC) onde propõe o limite de 5% em biocombustíveis de primeira geração no objetivo de substituir 10% dos combustíveis automóveis por biocombustíveis (48).

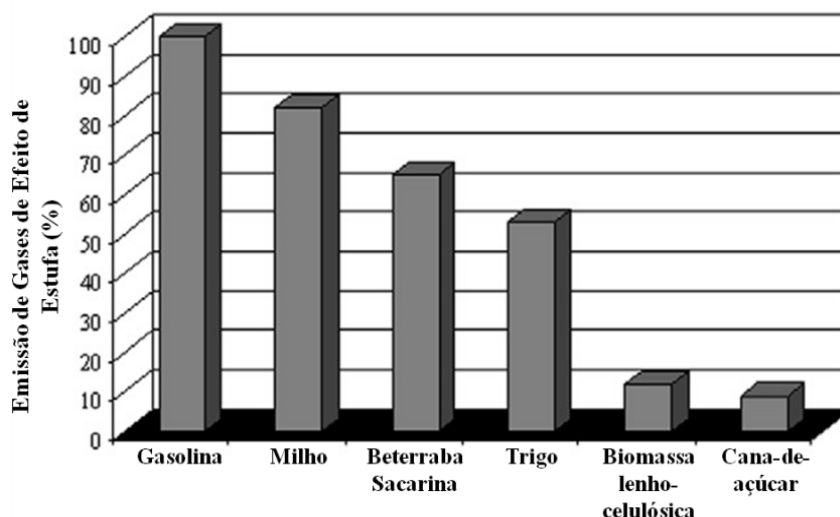


Figura 2.1 – Emissão de gases de efeito de estufa por bioetanol produzido a partir de diferentes matérias-primas em comparação com a gasolina (adaptado de (38)).

2.2.1 Bioetanol de segunda geração

Entre os materiais lenho-celulósicos utilizados na produção de bioetanol de segunda geração encontram-se a madeira (49), as culturas não alimentares, como a *Panicum virgatum* (50), os resíduos florestais (51), os resíduos agrícolas, como a palha de trigo (52), a palha de arroz (53), ou o bagaço de cana-de-açúcar (54), os resíduos sólidos municipais (55), e os subprodutos industriais, como licor de cozimento ao sulfito ácido (SSL, do inglês *spent sulfite liquor*) (56).

A composição da biomassa lenho-celulósica varia de espécie para espécie, mas de forma genérica consiste em 75% de polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) e 25% de lenhina (38). A celulose, que constitui entre 30 a 60% da matéria seca da biomassa lenho-celulósica, é um homopolissacarídeo não ramificado constituído por 5000 a 6000 unidades de β -D-glucopiranosose unidas pela ligação glicosídica β -(1 \rightarrow 4), sendo a unidade repetitiva a celobiose (formada por dois resíduos de glucose). As pontes de hidrogénio, tanto intramoleculares como intermoleculares, e a orientação das ligações são responsáveis pela estrutura fibrilar da celulose, composta por domínios de elevada cristalinidade intercalados

por regiões amorfas (6, 38). Por sua vez, as hemiceluloses, que constituem 20 a 40% da matéria seca da biomassa lenho-celulósica (38), são heteropolissacarídeos irregulares extremamente ramificados, constituídos por 100 a 200 unidades monoméricas, as quais podem ser pentoses (xilose e arabinose) e/ou hexoses (glucose, manose, e galactose). Nas hemiceluloses estes monómeros fazem parte das pentosanas, constituídas maioritariamente por pentoses, ou das hexosanas, constituídas maioritariamente por hexoses. Assim, as hemiceluloses mais comuns na biomassa lenho-celulósica são as xilanas, seguindo-se as mananas e as galactanas. As hemiceluloses ligam-se quimicamente à lenhina e o seu principal papel é regular a distribuição espacial da celulose e da lenhina, permitindo que estas moléculas adquiram a sua compatibilidade característica (57). Por fim, a lenhina, que constitui 15 a 25% da matéria seca da biomassa lenho-celulósica (38), é um polímero aromático amorfo composto por unidades de fenilpropano ligadas entre si por pontes carbono-carbono e/ou éter. A lenhina é responsável pela rigidez dos tecidos e pelas suas propriedades antissépticas e hidrofóbicas (6).

A madeira está entre as matérias-primas lenho-celulósicas mais abundantes e pode ser classificada como madeira de árvores resinosas (também conhecida como *softwood*), como a madeira de pinheiro ou abeto, ou como madeira de árvores folhosas (também conhecida como *hardwood*), como a madeira de eucalipto ou álamo. A madeira de árvores resinosas contém um teor ligeiramente menor em celulose que a madeira de árvores folhosas. No que diz respeito às hemiceluloses, a madeira de árvores folhosas é composta essencialmente por pentosanas (principalmente glucoronoxilanas) enquanto que a madeira de árvores resinosas é composta essencialmente por hexosanas (principalmente galactoglucomananas). Para além disso, o grau de acetilação apresentado pelas hemiceluloses da madeira de árvores folhosas é superior ao apresentado pelas hemiceluloses da madeira de árvores resinosas. Por sua vez, a lenhina tem origem em três precursores básicos, o álcool cumarílico, o álcool coniferílico, e o álcool sinapílico, e assim, conforme os precursores em que a lenhina tem origem formam-se estruturas diferentes. Na madeira de árvores resinosas a principal lenhina é a lenhina guaiacil (lenhina-G) que resulta da polimerização do álcool coniferílico. Já na madeira de árvores folhosas, a principal é a lenhina guaiacil-siringil (lenhina-GS) que resulta da copolimerização dos álcoois coniferílico e sinapílico. Para além disso, o teor em lenhina da madeira de árvores resinosas é superior ao da madeira de árvores folhosas (6, 38).

A produção de bioetanol de segunda geração pode ocorrer através da via termoquímica ou da via bioquímica. Na via termoquímica, a biomassa lenho-celulósica depois de reduzida a aparas é gasificada a elevada temperatura ou a elevada pressão e o gás de síntese resultante é convertido em etanol por síntese catalítica (58, 59). Por sua vez, na via bioquímica (Figura 2.2), as aparas de biomassa lenho-celulósica são sujeitas a pré-tratamento, depois os polissacarídeos são hidrolisados, os monómeros de açúcares são fermentados, e, por fim, o etanol produzido é purificado (38). A via bioquímica pode ser implementada com sucesso em regiões com elevado volume de biomassa lenho-celulósica disponível (59), como é o caso de Portugal (4). Nos parágrafos seguintes são apresentadas em mais detalhe as várias etapas da via bioquímica.

A biomassa lenho-celulósica é bastante recalcitrante à hidrólise, por isso, é sujeita a um pré-tratamento prévio para tornar a celulose mais acessível à hidrólise e assim, aumentar a recuperação de açúcares (60). A severidade deste processo tem de ser bem balanceada, pois se o pré-tratamento não for suficientemente eficiente a hidrólise dos polissacarídeos será difícil, no entanto, se o pré-tratamento for demasiado severo são produzidos compostos tóxicos que inibem o metabolismo microbiano (38). Entre os métodos de pré-tratamento mais comuns destacam-se os métodos físico-químicos, como a explosão de vapor (61) e a explosão de amónia (AFEX, do inglês *ammonia fiber explosion*) (62), os métodos químicos, que incluem a hidrólise ácida (63) e a hidrólise alcalina (64), o método de organosolv (65) e os métodos biológicos, normalmente com fungos da podridão branca da madeira (66).

Após o pré-tratamento, os polímeros de celulose e hemicelulose são hidrolisados, de modo a disponibilizar os açúcares na sua forma monomérica (38). A hidrólise destes polissacarídeos pode ser feita tanto quimicamente, com ácido diluído (67) ou concentrado (68), ou enzimaticamente, com celulasas e hemicelulasas (69). A hidrólise enzimática é mais vantajosa que a hidrólise ácida, pois, por um lado, as enzimas são muito seletivas, hidrolisando apenas os polissacarídeos, e por outro, previne-se a degradação dos açúcares e a corrosão dos equipamentos (38).

Nos passos de pré-tratamento e de hidrólise ácida são produzidos vários inibidores microbianos (60). A variedade e concentração destes compostos tóxicos dependem da matéria-prima utilizada e das condições de pré-tratamento e hidrólise aplicadas, nomeadamente, da temperatura, do tempo do processo, e da concentração de ácido (70). Os

compostos inibitórios obtidos podem classificar-se em três grupos principais: os ácidos fracos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico), os furaldeídos (furfural e hidroximetilfurfural (HMF)), e os compostos fenólicos. O ácido acético resulta da hidrólise dos grupos acetilo da hemicelulose. Por sua vez, o furfural e o HMF resultam da degradação das pentoses e das hexoses, respetivamente. Para além disso, o furfural e o HMF podem também eles ser degradados, dando origem ao ácido fórmico, que resulta tanto da degradação do furfural como do HMF, e ao ácido levulínico, que resulta da degradação do HMF. Por último, os compostos fenólicos têm origem na degradação da lenhina. Entre os vários compostos fenólicos destacam-se o ácido vanílico e a vanilina, formados a partir das unidades de guaiacilpropano, o ácido sirínico e o siringaldeído, formados a partir das unidades de siringilpropano, e o ácido hidroxibenzóico e o hidroxibenzaldeído (70). Para além destes três grupos principais de inibidores, devem ser ainda referenciados os metais pesados, resultantes da corrosão do equipamento, e os extrativos, nomeadamente, as resinas acídicas, os taninos e os ácidos terpénicos. Os extrativos são normalmente menos tóxicos que os restantes inibidores, no entanto, os hidrolisados de algumas madeiras como a de *Eucalyptus globulus* contêm elevada quantidade de taninos hidrolisáveis, o que origina ácido gálico e pirogallol, os quais também são compostos fenólicos (6). Assim, com vista a reduzir o teor de inibidores dos hidrolisados lenho-celulósicos, antes da fermentação procede-se por vezes a um passo de desintoxicação (71), o qual pode ser biológico (72), enzimático (73), físico, por evaporação (74) ou por adsorção com carvão ativado (75), ou químico, por tratamento alcalino (76) ou por resinas de troca iónica (77).

Após a hidrólise, os monómeros de açúcares estão prontos a ser convertidos a etanol por fermentação. A *S. cerevisiae* é a espécie mais utilizada para a produção de bioetanol de primeira geração, pois fermenta a glucose com um elevado rendimento, e apresenta elevada tolerância aos inibidores e às elevadas pressões osmóticas (60). Para além da *S. cerevisiae*, a bactéria *Zymomonas mobilis* também tem sido aplicada com sucesso na produção de bioetanol de primeira geração devido à sua elevada produtividade (78). No entanto, a *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar as pentoses, e a *Z. mobilis*, apesar de conseguir fermentar a frutose, não fermenta a xilose, a qual é a pentose mais abundante dos hidrolisados lenho-celulósicos (8). A fermentação das pentoses é extremamente importante para a viabilidade económica do bioetanol de segunda geração a partir de

hidrolisados lenho-celulósicos, dado que uma parte significativa dos açúcares presentes são pentoses (8). Por este motivo, na produção de bioetanol de segunda geração têm sido empregadas leveduras que fermentam as pentoses (79), tais como a *S. stipitis* (80), a *Candida shehatae* (81), e a *Pachysolen tannophilus* (82), pois estas leveduras são capazes de fermentar tanto as pentoses como as hexoses (79). Para além destas, também se têm testado estirpes geneticamente modificadas de *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* e *E. coli* capazes de fermentar as pentoses pela expressão de genes das leveduras que fermentam as pentoses nativamente (79). No entanto, apesar dos consideráveis progressos que têm sido feitos ao nível do desenvolvimento de estirpes recombinantes (83), as leveduras que fermentam nativamente as pentoses continuam entre os melhores microrganismos para a produção de bioetanol de segunda geração.

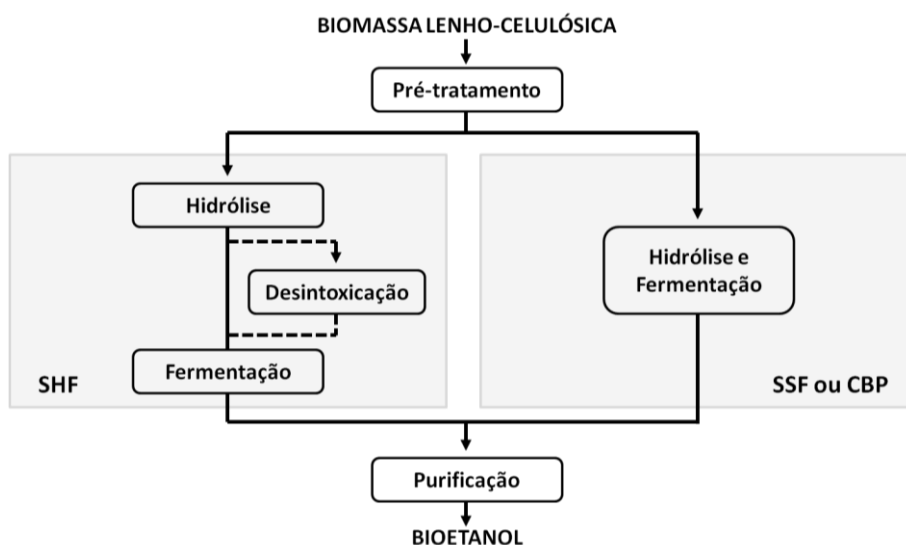


Figura 2.2 – Estratégias de produção de bioetanol de segunda geração pela via bioquímica.

A produção de bioetanol de segunda geração pode realizar-se através de várias estratégias de hidrólise e fermentação (Figura 2.2). Na hidrólise e fermentação separadas (SHF, do inglês *separate hydrolysis and fermentation*) os passos de hidrólise e fermentação são realizados em reatores diferentes (84). Esta estratégia tem como principal vantagem permitir que ambos os passos ocorram nas suas condições ótimas. No entanto, a acumulação da glucose durante o passo de hidrólise tem um efeito inibitório sobre as celulasas (38). Por sua vez, na estratégia de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF, do inglês *simultaneous saccharification and fermentation*), a hidrólise dos polissacarídeos ocorre ao mesmo tempo que a fermentação dos açúcares libertados (85), pelo que se evita assim a inibição das enzimas pelo produto (38). Contudo, esta estratégia requer que as

condições do processo sejam compatíveis tanto com a hidrólise como com a fermentação, pelo que é difícil operar nas condições ótimas de ambos os passos (38). Por último, perspectiva-se ainda o bioprocessamento consolidado (CBP, do inglês *consolidated bioprocessing*) como uma das estratégias mais promissoras para o futuro, pois combina num único passo a produção das celulasas e hemicelulasas, a hidrólise dos polissacarídeos, e a fermentação dos monómeros de açúcares. Esta estratégia recorre para isso normalmente a microrganismos geneticamente modificados capazes de produzir tanto etanol como celulasas e hemicelulasas (86, 87).

Por fim, o bioetanol produzido é normalmente purificado por destilação (38). No entanto, a destilação acarreta um elevado custo energético, pelo que têm sido propostos métodos alternativos. Os métodos de remoção do etanol *in situ* são os mais promissores, pois atenuam a inibição que a acumulação de etanol tem sobre os microrganismos, aumentando assim a produtividade (8). Entre os métodos de remoção de etanol *in situ* destacam-se a destilação por membrana a vácuo (88), a pervaporação (89), o *gas stripping* por CO₂ (90), a extração líquido-líquido (91) e a adsorção (92).

De modo a tornar a produção industrial de bioetanol de segunda geração economicamente viável é necessário explorar ao máximo as potencialidades da biomassa lenho-celulósica (8). Isto pode-se alcançar numa biorefinaria, onde se integram vários processos, de modo, a não só produzir bioetanol, mas também energia e outros produtos de valor acrescentado (93). Por exemplo, a lenhina, que não é utilizada na produção de bioetanol, pode ser utilizada para gerar energia, dado o seu elevado poder calorífico, mas também químicos, como o benzeno, o tolueno, ou o fenol (94).

2.2.1.1 Licor de cozimento ao sulfito ácido (SSL)

O SSL é um subproduto da indústria papeleira que é produzido em grande quantidade e que apresenta grande potencial para a produção de bioetanol de segunda geração, dado o seu elevado conteúdo em açúcares livres. Este subproduto industrial resulta do processo de cozimento ao sulfito ácido da madeira com vista à produção de pasta de papel, onde o principal objetivo é a remoção da lenhina, mantendo a integridade das fibras de celulose (6).

No processo de cozimento ao sulfito ácido (Figura 2.3) as aparas de madeira são impregnadas num digestor descontínuo com o licor de cozimento, composto por uma

solução aquosa de $\text{SO}_2/\text{MeHSO}_3^-$ (Me – base do cozimento: amônia, magnésio, cálcio ou sódio). O processo tem uma duração de 3 a 7 horas, ocorre a um pH entre 1 e 2 e a uma temperatura entre 125 e 145 °C. A deslenhificação da madeira ocorre devido às reações de sulfonação, que originam grupos sulfônicos hidrofílicos na cadeia de lenhina hidrofóbica, e às reações de hidrólise das ligações entre as unidades de fenilpropano. Assim, no final do processo obtém-se a pasta crua sólida, composta pelas fibras de celulose e algumas hemiceluloses, e o SSL. A pasta crua depois de lavada segue para o branqueamento, enquanto que, o resíduo líquido, o SSL, é evaporado (6).

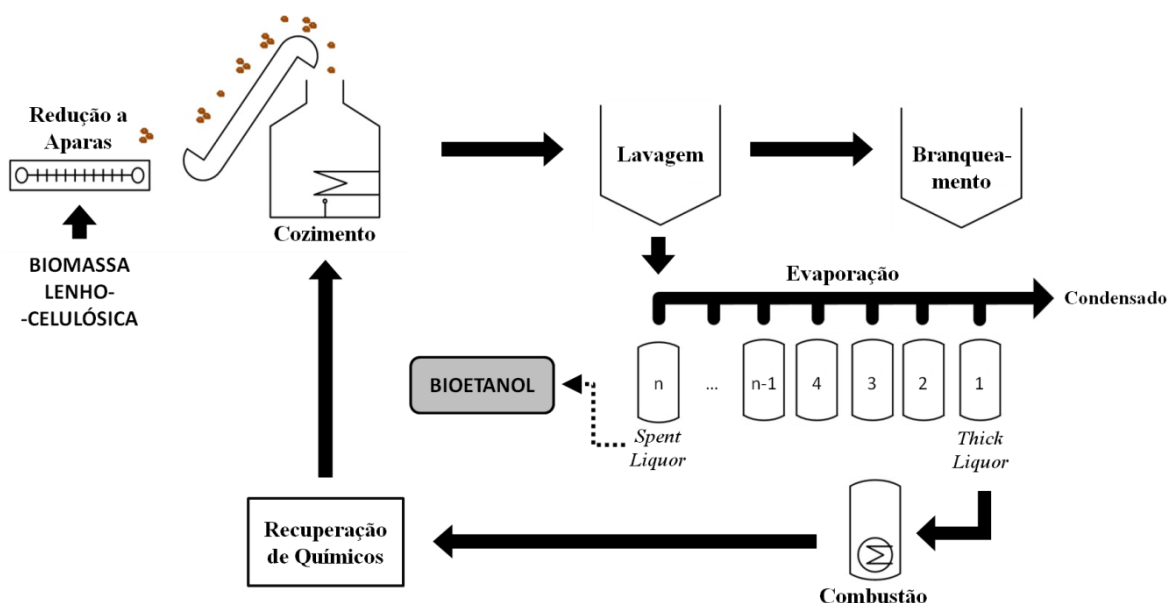


Figura 2.3 – Processo de cozimento ao sulfito ácido da biomassa lenho-celulósica (adaptado de (6)).

O SSL apresenta uma elevada carga orgânica o que impede que este resíduo possa ser alienado sem tratamento prévio. Por esse motivo, este subproduto é normalmente queimado para a produção de energia e para a recuperação de produtos químicos (Figura 2.3). No entanto, durante o cozimento ao sulfito ácido uma parte significativa dos polissacarídeos da madeira, provenientes maioritariamente das hemiceluloses, é hidrolisada devido às intensas condições do processo, o que permite que o SSL apresente um elevado conteúdo em açúcares que podem ser fermentados a etanol. Assim, a produção de bioetanol a partir de SSL é bastante vantajosa, pois não é necessário o passo prévio de hidrólise da biomassa lenho-celulósica. Para além disso, o SSL também pode ser utilizado como substrato para a produção de outros bioprodutos e para a obtenção de vários compostos químicos de elevado valor acrescentado, como compostos fenólicos e ácidos orgânicos. Assim, a produção de bioetanol, a par da geração de energia e da obtenção de

produtos químicos, a partir do SSL constitui uma forma de valorizar este subproduto e de melhorar a sustentabilidade da indústria (6).

Como já foi referido na secção 2.2.1, a composição da madeira das árvores resinosas é diferente da madeira das árvores folhosas, pelo que o SSL produzido a partir de cada uma, SSSL (do inglês *softwood spent sulfite liquor*) e HSSL (do inglês *hardwood spent sulfite liquor*) respetivamente, também tem uma composição diferente. Os principais componentes dos SSLs são os lenhosulfonatos e os açúcares. Os lenhosulfonatos são oligómeros de lenhina parcialmente sulfonados que apresentam um efeito adverso sobre a fermentação. Por sua vez, os açúcares encontram-se tanto na forma de monómeros simples como de oligossacarídeos, e como a hemicelulose da madeira das árvores folhosas é rica em pentosanas e a das árvores resinosas é rica em hexosanas, o HSSL é mais rico em pentoses e o SSSL é mais rico em hexoses. Deste modo, a xilose é de longe o açúcar em maior concentração no HSSL. Para além deste, são ainda relevantes as concentrações de glucose, arabinose, manose e galactose. No entanto, para além destes componentes os SSLs possuem ainda um elevado conteúdo em inibidores. A concentração de ácido acético é particularmente elevada no HSSL, devido ao facto da hemicelulose da madeira das árvores folhosas possuir um maior grau de acetilação (6). Para além deste, são também relevantes as concentrações dos compostos fenólicos de baixo peso molecular, destacando-se no HSSL o ácido gálico, o pirogalol, o siringaldeído, e o ácido vanílico (72). Por sua vez, nos SSLs, e em particular no HSSL, tanto a concentração de furfural como a de HMF é bastante reduzida. Para além disso, os SSLs também não possuem SO₂ livre, pois este é eliminado durante a primeira etapa de evaporação (6).

A produção do bioetanol a partir de SSSL realiza-se convencionalmente através da fermentação com *S. cerevisiae* (6). No entanto, no HSSL como os açúcares em maior abundância são as pentoses, recorre-se normalmente a leveduras que fermentam as pentoses (6), designadamente a *S. stipitis*, uma das leveduras com maior capacidade para fermentar a xilose (9). No entanto, esta levedura apresenta uma reduzida tolerância aos inibidores, sendo o HSSL normalmente sujeito a um passo prévio de desintoxicação (6). Pereira *et al.* (2012), utilizando a levedura *S. stipitis* alcançaram uma concentração máxima de etanol de 2,4 g.L⁻¹ e um rendimento em etanol, $Y_{\text{etanol/substrato}}$, de 0,24 g.g⁻¹ através da desintoxicação prévia do HSSL com o fungo *Paecilomyces variotii* (72). Alternativamente, como se verá na secção 2.3.3.1, a tolerância da *S. stipitis* aos inibidores pode ser melhorada

por engenharia evolutiva (95). Nigam (2001) obteve uma concentração máxima de etanol de 20,2 g.L⁻¹ e um $Y_{\text{etanol/substrato}}$ de 0,41 g.g⁻¹ através da desintoxicação do HSSL com Ca(OH)₂ e da adaptação da *S. stipitis* (96).

2.3. *Scheffersomyces stipitis*

A *S. stipitis*, antes classificada como *Pichia stipitis* (97), é uma levedura homotética, da classe dos hemiascomycetes, que se encontra maioritariamente na forma haploide (98), e cuja temperatura e pH ótimos para a fermentação são de 25-33 °C e de 4,5-5,5, respetivamente. Esta levedura encontra-se naturalmente na madeira em apodrecimento ou nas larvas de insetos que habitam a madeira. Este nicho ecológico permitiu que a *S. stipitis* desenvolvesse a capacidade de utilizar a maioria dos açúcares da madeira (99). Assim, a *S. stipitis* é capaz de converter a etanol tanto hexoses como pentoses, sendo dos microrganismos com maior capacidade nativa para fermentar a xilose (9), o que a torna no microrganismo com maior potencial para a produção de bioetanol de fontes lenho-celulósicas, especialmente a partir de HSSL (6). No entanto, esta levedura apresenta alguns desafios, nomeadamente, ao nível da sua tolerância aos inibidores e das suas condições de arejamento ótimas para a fermentação etanólica.

2.3.1 Consumo de açúcares

A *S. stipitis* é capaz de fermentar a etanol a glucose, a manose, a galactose e a xilose. Todavia, apesar de conseguir utilizar a arabinose para crescer, não a consegue utilizar para produzir etanol (100, 101). Para além disso, a *S. stipitis* também produz várias celulasas e hemicelulasas, o que permite que esta levedura seja também capaz de utilizar a celobiose e oligómeros de hemicelulose (98).

A glucose e a xilose podem ser transportadas por difusão facilitada para o interior das células de *S. stipitis* quando a sua concentração é elevada, contudo o sistema tem maior afinidade pela glucose do que pela xilose (102). Alternativamente, a glucose e a xilose também podem ser assimiladas por transporte ativo. Neste caso, quando a concentração de açúcares é baixa, o transporte é feito por um sistema de simporte de prótons de alta afinidade, e quando a concentração de açúcares é elevada, o transporte é feito por um sistema de simporte de prótons de baixa afinidade, o qual é usado tanto pela glucose como pela xilose. Assim, quando a concentração de açúcares é elevada a glucose inibe o

transporte de xilose (99). Por este motivo, a *S. stipitis* consome preferencialmente a glucose, sendo observada uma utilização sequencial destes açúcares (100, 103, 104). Para além disso, a glucose também reprime a expressão da xilose redutase (XR) e da xilitol desidrogenase (XDH), as quais são enzimas envolvidas no metabolismo da xilose. Desta forma, ocorre um crescimento diáuxico, pois após o esgotamento da glucose o crescimento cessa até que sejam sintetizadas as enzimas necessárias para o metabolismo da xilose (104, 105). Contudo, a fase lag diáuxica, na transição da glucose para a xilose, pode ser minimizada pelo aumento da concentração celular inicial (≥ 2 g/L) (103), ou pela inoculação de células previamente crescidas em xilose (105).

2.3.2 Metabolismo da xilose

O metabolismo da xilose na *S. stipitis* (Figura 2.4) inicia-se com a redução da xilose a xilitol pela enzima XR, dependente de NADPH ou NADPH. Segue-se depois a oxidação do xilitol a xilulose pela XDH, dependente de NAD⁺. Num terceiro passo, a xilulose é fosforilada a xilulose-5-fosfato (X5P) pela xiluloquinase (XK), com consumo de uma molécula de ATP. A X5P entra então, na via das pentoses fosfato, onde é convertida em gliceraldeído-3-fosfato, o qual, através da via glicolítica, é depois convertido em piruvato. Por fim, o piruvato é convertido em acetaldeído pela piruvato descarboxilase (PDC), e o acetaldeído é reduzido a etanol pela álcool desidrogenase (ADH) (99).

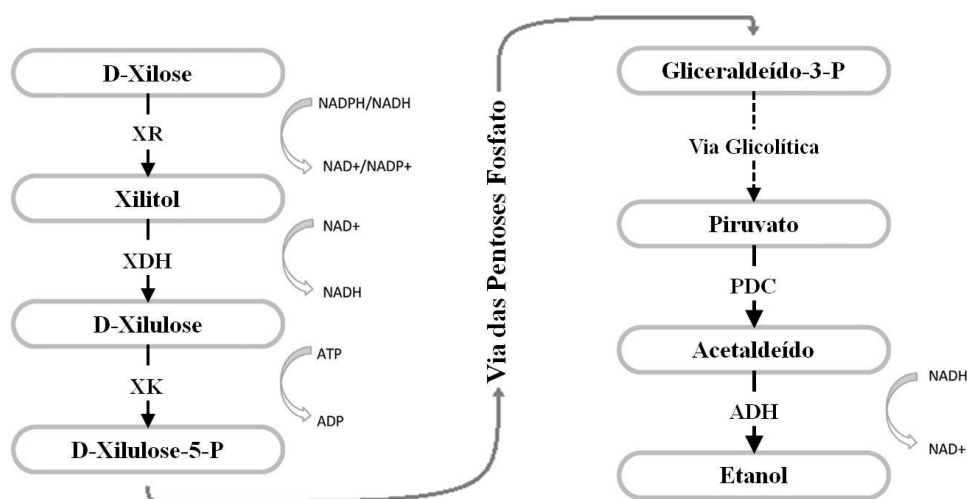


Figura 2.4 – Metabolismo da xilose em *S. stipitis* (adaptado de (6)).

Na maioria das leveduras e dos fungos filamentosos, a xilose é reduzida a xilitol pela XR, dependente apenas de NADPH, e depois o xilitol é oxidado a xilulose pela XDH,

dependente de NAD^+ . Assim, a diferença entre o cofator da XR e da XDH cria um desequilíbrio no balanço entre os cofatores destas enzimas (99). O NADPH pode ser regenerado através da via das pentoses fosfato (106), no entanto o NAD^+ depende da cadeia respiratória para ser regenerado, assim em condições anaeróbicas ocorre um desequilíbrio entre o NADH e o NAD^+ que conduz à acumulação de xilitol (106). Só um grupo muito restrito de leveduras, do qual faz parte a *S. stipitis*, é que consegue fermentar a xilose a etanol sob limitação de oxigénio (99), porque a sua XR utiliza tanto o cofator NADPH como o NADH (107-109). Deste modo, para a produção de etanol o ideal é que a XR utilize o NADH e não o NADPH, de modo a criar um balanço equilibrado com o NAD^+ que serve de cofator à XDH e assim, permitir que todo o xilitol seja convertido em xilulose (99). No entanto, a *S. stipitis* possui ainda uma cadeia transportadora de eletrões com citocromo c e sem citocromo c (110). Esta última é chamada via sensitiva do ácido salicil-hidroxicinâmico e cria um espaço para a ocorrência de reações redox, o que permite contrabalançar o desequilíbrio entre o NADH e o NAD^+ . Este facto permite assim explicar a razão pela qual a *S. stipitis* produz menos xilitol que outras leveduras que também possuem os dois cofatores para a enzima XR. Esta também é a razão pela qual várias das estirpes de *S. cerevisiae* modificadas com os genes da XR e XDH da *S. stipitis* acumulam quantidades consideráveis de xilitol (99).

2.3.3 Tolerância aos inibidores

A menor tolerância da *S. stipitis* aos inibidores dos hidrolisados lenho-celulósicos, em comparação com a *S. cerevisiae*, constitui um dos principais obstáculos à utilização desta levedura na produção de bioetanol (10). Este é inclusivamente um dos maiores entraves à produção comercial de bioetanol a partir de HSSL (6). Com efeito, a tolerância da *S. stipitis* depende do tipo de inibidor, da sua concentração e do seu mecanismo de inibição (6).

Os ácidos fracos, tais como o ácido acético, o ácido fórmico e o ácido levulínico, inibem o crescimento e a fermentação. Xavier *et al.* (2010) verificaram que na presença de $9,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético a *S. stipitis* era completamente inibida (56). A forma protonada dos ácidos fracos consegue atravessar a membrana celular e quando chega ao citoplasma dissocia-se devido ao maior pH intracelular, o que conduz à diminuição do pH citoplasmático. Assim, de modo a manter o pH intracelular, as ATPases membranares

bombeiam os prótons para fora da célula à custa da hidrólise de ATP, o que diminui o ATP disponível para o crescimento. Porém, para além disso, quando se acumulam elevadas quantidades destes ácidos no interior da célula as ATPases não conseguem compensar o aumento de prótons, o que resulta assim na acidificação do citoplasma e consequentemente na inibição do crescimento. Por outro lado, a inibição pelos ácidos fracos também pode resultar da sua interferência direta nos processos celulares quando estes se encontram dentro da célula (70, 111). Assim, de modo a prevenir a entrada dos ácidos fracos na célula, deve utilizar-se um pH superior ao pKa destes ácidos, para que estes se encontrem maioritariamente na sua forma desprotonada (70). A toxicidade dos ácidos fracos é diferente entre eles, o que pode estar relacionado com as diferentes permeabilidades da membrana celular a cada um deles ou com as diferentes toxicidades da sua forma desprotonada (70, 111). Para além disso, Bellido *et al.* (2011) verificaram que o consumo de xilose é mais afetado que o consumo de glucose (112), o que se pode explicar pelo facto de a xilose gerar menos ATP que a glucose (106). Por sua vez, van Zyl *et al.* (1991) verificaram que num meio contendo ácido acético o crescimento da *S. stipitis* era mais afetado em condições de limitação de oxigénio do em condições aeróbias (113), o que demonstra que a disponibilidade de oxigénio também desempenha um papel importante na tolerância da *S. stipitis* aos ácidos fracos.

O furfural e o HMF aumentam a fase lag, inibem o crescimento e reduzem a produtividade em etanol (112, 114, 115). A *S. stipitis* assimila o furfural e o HMF antes de produzir biomassa e etanol (116), o que explica assim o aumento da fase lag, pois as células necessitam de mais tempo para sintetizar as enzimas necessárias à remoção destes compostos (112). Por sua vez, a inibição do crescimento pode ser explicada pelo redireccionamento da energia da célula para a reparação dos danos provocados por estes compostos e pela redução dos níveis de ATP e NAD(P)H em resultado da inibição enzimática ou do consumo destes cofatores (111). Nigam (2001) mostrou que a adição de 0,27 g.L⁻¹ de furfural não afeta a produção de etanol por *S. stipitis*, no entanto a adição de 1,5 g.L⁻¹ de furfural reduziu o rendimento e a produtividade em etanol em 90,4% e 85,1%, respetivamente (115).

Os compostos fenólicos, especialmente os de baixo peso molecular (70), estão entre os inibidores mais tóxicos para os microrganismos, afetando tanto o crescimento como o rendimento em etanol (117). Estes compostos levam provavelmente à perda da integridade

das membranas celulares, as quais deixam assim de servir de barreira seletiva e de matriz enzimática (70). Para além disso, os compostos fenólicos de baixo peso molecular podem ainda inibir a síntese de aminoácidos (118). Xavier *et al.* (2010) mostraram que mesmo após a remoção do ácido acético a *S. stipitis* era incapaz de produzir etanol a partir de HSSL devido ao seu elevado teor em compostos fenólicos (56).

Para além disso, tem-se verificado ainda que quando combinados os inibidores apresentam uma toxicidade superior à resultante da soma das toxicidades de cada um, o que indica que existe um efeito sinérgico entre os vários inibidores (114, 115, 117).

2.3.3.1 Adaptação da *S. stipitis* aos inibidores

A introdução de um passo de desintoxicação aumenta os custos associados à produção de bioetanol (95). Por esse motivo, a estratégia mais vantajosa do ponto de vista económico para ultrapassar os efeitos nefastos dos inibidores dos hidrolisados lenho-celulósicos passa pelo desenvolvimento de estirpes tolerantes a esses inibidores (95). Estas estirpes podem ser obtidas por engenharia evolutiva (119), a qual utiliza técnicas como a mutagénesis (120) ou a adaptação (96, 121-125). Com efeito, atendendo à vasta variedade de inibidores e ao efeito sinérgico entre eles, a adaptação aos hidrolisados lenho-celulósicos é das estratégias mais eficientes na obtenção destas estirpes. Esta adaptação é alcançada pela propagação contínua ou sequencial da levedura num meio com o aumento gradual da percentagem de hidrolisado. Deste modo, obtêm-se estirpes que apresentam melhor crescimento, menor fase lag, maior taxa de consumo de açúcares e maior produtividade e rendimento em etanol (95). Para além disso, as estirpes adaptadas permitem ainda realizar os processos a menor pH, o que reduz assim o risco de contaminação (122, 124)

A *S. stipitis* tem sido adaptada a diversos substratos (96, 121-125). Na Tabela 2.1. são apresentados os resultados alcançados por estirpes selvagens e adaptadas de *S. stipitis* na fermentação de vários substratos. O HSSL encontra-se entre os substratos aos quais a *S. stipitis* já foi adaptada (96, 121). Pereira *et al.* (2015) obtiveram uma população de *S. stipitis* adaptada ao HSSL através da operação de um reator contínuo com mistura perfeita durante 382 gerações. Da população adaptada isolaram um clone estável com maior capacidade para resistir aos inibidores do HSSL, o qual apresentou uma taxa específica de crescimento quase duas vezes superior à da estirpe selvagem e melhores valores de

produtividade e de rendimento em etanol que a estirpe selvagem (121). Por sua vez, Nigam (2001) obteve uma estirpe de *S. stipitis* adaptada ao HSSL através do crescimento sequencial da levedura em meio com concentrações crescentes de HSSL. A estirpe adaptada obtida por este autor apresentou na fermentação de HSSL não desintoxicado um $Y_{etanol/substrato}$ 1,75 vezes maior que o da estirpe selvagem e uma taxa volumétrica de produção de etanol, r_{etanol} , 7,0 vezes superior à da estirpe selvagem (96).

Tabela 2.1 – Desempenho de estirpes selvagens e adaptadas de *S. stipitis* na fermentação de diferentes substratos.

Substrato	Estirpe		$Y_{etanol/substrato}^a$ (g.g ⁻¹)	r_{etanol}^b (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Referência
HSSL do cozimento de eucalipto (60% v/v)	NRRL Y-7124	Selvagem	0,13	0,02	(121)
		Adaptada	0,16	0,05	
HSSL do cozimento de carvalho	NRRL Y-7124	Selvagem	0,16	0,01	(96)
		Adaptada	0,28	0,07	
Hidrolisado hemicelulósico de carvalho (50% v/v)	NRRL Y-7124	Selvagem	0,05	0,001	(122)
		Adaptada	0,26	0,05	
Hidrolisado hemicelulósico de ácer (75% v/v)	NRRL Y-7124	Selvagem	0,40	0,12	(123)
		Adaptada	0,49	0,24	
Hidrolisado de palha de arroz	BCRC 21777	Selvagem	0,40	0,22	(124)
		Adaptada	0,44	0,24	
Hidrolisado de palha de milho	CBS 6054	Selvagem	0,00	0,00	(125)
		Adaptada	0,45	0,88	

^aRendimento em etanol. ^bTaxa volumétrica de produção de etanol.

2.3.4 Efeito da disponibilidade de oxigénio na produção de etanol

A disponibilidade de oxigénio é um fator crítico na fermentação dos açúcares a etanol por *S. stipitis*, pois determina a partição do fluxo de carbono entre o crescimento e a da formação de etanol (11). Em condições aeróbias, a *S. stipitis* metaboliza os açúcares através da via respiratória, pelo que o crescimento celular é favorecido e a produção de etanol reprimida. Para além disso, quando a disponibilidade de oxigénio é extremamente elevada, observa-se o efeito de Pasteur, ou seja, verifica-se uma redução significativa do consumo de açúcares, devido à inibição do seu transporte pelo oxigénio (11, 126). A *S. cerevisiae*, por sua vez, é capaz de produzir etanol em aerobiose quando a concentração de açúcares é bastante elevada, ou seja, apresenta efeito de Crabtree. No entanto, a *S. stipitis* em aerobiose é incapaz de produzir etanol mesmo na presença de um excesso de açúcares,

pelo que esta levedura é assim classificada como Crabtree negativa (127, 128). Em condições anaeróbias a *S. stipitis* não apresenta metabolismo respiratório, em resultado da inativação das mitocôndrias (14). No entanto, nestas condições a produção de etanol e o consumo de açúcares também são bastante limitados (129-131). Assim, as melhores condições para a produção de etanol na *S. stipitis* verificam-se em microaerobiose, sendo também sob estas condições que ocorre a maior taxa de consumo de açúcares (11).

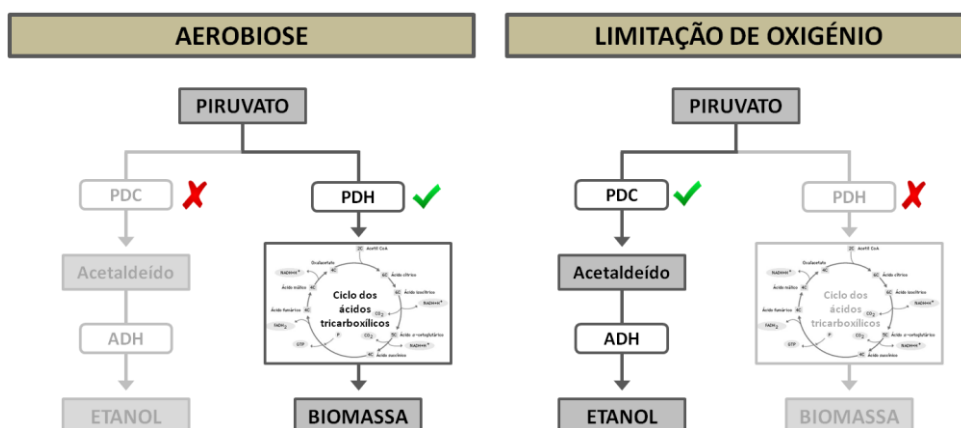


Figura 2.5 – Conversão do piruvato em *S. stipitis* sob condições aeróbias e sob limitação de oxigénio.

Existe uma competição entre a produção de etanol e a produção de biomassa, e, assim, quando o rendimento em etanol aumenta, o rendimento em biomassa diminui, e vice-versa. Esta competição explica-se pelo facto dos dois produtos, etanol e biomassa, utilizarem o mesmo precursor, o piruvato. Deste modo, quando o rendimento em etanol aumenta, a disponibilidade do piruvato para a produção de biomassa diminui (14). A utilização do piruvato para produzir etanol ou biomassa depende da disponibilidade de oxigénio. Sob condições aeróbias, todo o piruvato é metabolizado através da reação catabolizada pela piruvato desidrogenase (PDH), que direciona o metabolismo para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, uma vez que, a PDC está inativa. Contudo, sob limitação de oxigénio, a PDC é induzida e a via fermentativa fica disponível (Figura 2.5). Ao contrário da *S. cerevisiae*, a ativação da PDC na *S. stipitis* não tem origem na via glicolítica pelo aumento da concentração de piruvato. A PDH tem maior afinidade pelo piruvato que a PDC, porém, a limitação do oxigénio aumenta o NADH intracelular o que inibe a PDH, deixando o piruvato disponível para ser utilizado pela PDC, e assim, o fluxo metabólico é orientado para a via fermentativa. Todavia, a PDH e a cadeia respiratória são expressas constitutivamente, pelo que o regresso a condições aeróbias elimina a inibição da PDH pelo NADH, permitindo que o piruvato flua novamente para a via respiratória (128).

2. Revisão Bibliográfica

Tabela 2.2 – Condições de arejamento ótimas para a produção de etanol por *S. stipitis*.

Referência	Substrato	Caudal de ar (vvm)	Agitação (rpm)	K_La (h ⁻¹)	OTR (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{etanol/substrato}$ ^a (g.g ⁻¹)	r_{etanol} ^b (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
(132)	Xilose (50 g.L ⁻¹)	0,08	250	4,8	ND	0,35	0,14
(131)	Xilose (50 g.L ⁻¹)	0,005	800	ND	1,75	0,43	ND
(130)	Xiilose (50 g.L ⁻¹)	0,1	160	2,3	0,58	0,40	ND
(11)	Xilose (90 g.L ⁻¹) Glucose (15 g.L ⁻¹) Arabinose (15 g.L ⁻¹)	ND	ND	4,9	ND	0,32	0,32
(133)	Glucose (35 g.L ⁻¹) Xilose (20 g.L ⁻¹)	0,10	175	3,3	ND	0,40	0,30
(96)	HSSL do cozimento de carvalho (desintoxicado)	ND	ND	ND	2,00	0,41 ^c	0,44 ^c
(101)	Hidrolisado de jacinto-de-água (desintoxicado)	0,02	250	ND	ND	0,35	0,17
(133)	Hidrolisado de palha de trigo (desintoxicado)	ND	175	3,8	ND	0,41	ND
(134)	Hidrolisado de palha de arroz (desintoxicado)	0,05	100	ND	ND	0,44 ^c	0,25 ^c

^aRendimento em etanol. ^bTaxa volumétrica de produção de etanol. ^cResultado obtido com uma estirpe de *S. stipitis* adaptada. ND – Dados não disponíveis.

Os melhores valores de produtividade em etanol na *S. stipitis* não se verificam em anaerobiose mas sim em microaerobiose, devido ao facto do fornecimento de oxigénio em quantidades limitadas estimular a produção de etanol (135). Na maioria das leveduras que fermentam as pentoses o papel do oxigénio enquanto aceitador terminal de eletrões permite que o sistema de transferência de eletrões da levedura equilibre o rácio entre o NADH e o NAD⁺. Desta forma, a levedura ultrapassa o desequilíbrio redox que se verifica nos dois passos iniciais do metabolismo da xilose, impedindo assim que o xilitol se acumule como subproduto (131). No entanto, a *S. stipitis* acumula pouco xilitol como subproduto (100, 132, 135-137) e, para além disso, o estímulo à produção de etanol também se verifica quando é utilizada apenas a glucose (138). Por este motivo, o estímulo da fermentação pelo oxigénio na *S. stipitis* não se deve apenas ao equilíbrio do balanço entre o NADH e o NAD⁺ (136, 138). A ativação ou indução do sistema de transporte de açúcares pelo oxigénio é uma explicação plausível para este fenómeno. De facto, como a assimilação da xilose e da glucose está dependente em parte do transporte ativo, o oxigénio ao permitir

gerar a energia necessária a este transporte estimula a fermentação. Alternativamente, o papel do oxigénio pode estar relacionado com o crescimento, com a manutenção da viabilidade celular, ou ainda com o funcionamento da mitocôndria (136).

As condições de arejamento para a produção de etanol por *S. stipitis* têm sido alvo de vários estudos (Tabela 2.2). Silva *et al.* (2012) compararam o desempenho da *S. stipitis* numa gama de valores de K_{La} entre 0,7 e 65,8 h⁻¹, e verificaram que o melhor rendimento em biomassa, $Y_{biomassa/substrato}$ (0,54 g.g⁻¹) ocorria no maior valor de K_{La} (65,8 h⁻¹), enquanto que o melhor $Y_{etanol/substrato}$ (0,33 g.g⁻¹) ocorria no menor valor de K_{La} (0,7 h⁻¹). Contudo, o melhor balanço entre a produtividade e rendimento em etanol verificou-se em valores intermédios de K_{La} , 2,3 e 4,9 h⁻¹, obtendo-se uma r_{etanol} de 0,27 e 0,32 g.L⁻¹.h⁻¹ e um $Y_{etanol/substrato}$ de 0,26 e 0,32 g.g⁻¹, respetivamente (11). Noutro estudo, Silva *et al.* (2010), utilizando Erlenmeyers de 250 mL com volumes úteis de 50, 75 e 100 mL, estudaram quais os melhores valores de velocidade de agitação e de rácio entre o volume total e o volume útil para a produção de etanol por *S. stipitis*. Estes autores verificaram assim que, apesar do maior $Y_{etanol/substrato}$ (0,42 g.g⁻¹) ter sido obtido com a menor velocidade de agitação (100 rpm) e o menor rácio entre o volume total e o volume útil (2,5 V_{total}.V_{útil}⁻¹), a melhor combinação de $Y_{etanol/substrato}$ (0,37 g.g⁻¹) e r_{etanol} (0,39 g.L⁻¹.h⁻¹) foi obtida com a maior velocidade de agitação (200 rpm) e o menor rácio entre o volume total e o volume útil (2,5 V_{total}.V_{útil}⁻¹) (139). Por sua vez, du Preez *et al.* (1989) estudaram a influência da disponibilidade de oxigénio na produção de etanol por *S. stipitis* com base na tensão de oxigénio dissolvido, DOT (do inglês *dissolved oxygen tension*), a qual expressa a percentagem de saturação em oxigénio do meio fermentativo. Estes autores verificaram assim que tanto o melhor $Y_{etanol/substrato}$ (0,44 g.g⁻¹) como a melhor r_{etanol} eram obtidos com uma DOT abaixo de 1% de saturação (140). Para além do estudo em meios sintéticos, as condições de arejamento também têm sido estudadas em meios contendo hidrolisados lenho-celulósicos. Nigam (2001) estudou qual a melhor *OTR* para a fermentação de HSSL e obteve como valor ótimo 2 mmol.L⁻¹.h⁻¹ (96). Noutro estudo Nigam (2002) obteve o caudal de ar de 0,02 vvm e a velocidade de agitação de 250 rpm como as melhores condições de arejamento para a fermentação de hidrolisado de jacinto-de-água (101). Mais recentemente, Bellido *et al.* (2013) compararam a fermentação de hidrolisado de palha de trigo numa gama de valores de K_{La} de 1,1 a 9,6 h⁻¹ e obtiveram como K_{La} ótimo o valor de 3,8 h⁻¹. Atendendo aos resultados obtidos nos vários estudos de otimização das condições

de arejamento para a produção de etanol por *S. stipitis* (Tabela 2.2), a melhor estratégia para a produção de etanol deve considerar a realização do processo em dois passos, um primeiro em aerobiose para obter uma elevada densidade celular, e um segundo em microaerobiose para maximizar a produção de etanol (129).

2.3.4.1 Reassimilação de etanol

Em aerobiose o etanol é reassimilado pela *S. stipitis*, é oxidado a acetaldeído, e este, por sua vez, é oxidado a acetato. O acetaldeído e o acetato podem acumular-se no interior da célula, podem ser excretados para o meio extracelular, ou podem, alternativamente, ser oxidados através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Todavia, apesar de poderem ser utilizados como fonte de carbono, a acumulação intracelular do acetaldeído e do acetato é tóxica para a célula, o que leva assim à inibição do crescimento e da fermentação. Isto explica em parte porque é que a *S. stipitis* é menos tolerante ao etanol que a *S. cerevisiae*, pois como o etanol não é reassimilado em anaerobiose, a *S. cerevisiae* não o oxida e, por conseguinte, não tem de lidar com o efeito tóxico dos compostos resultantes da sua oxidação. No entanto, a reassimilação do etanol pode ser minimizada pela redução do oxigénio disponível, pelo que, a limitação de oxigénio também aumenta a tolerância da *S. stipitis* ao etanol (141). Para além disso, ao se minimizar a reassimilação do etanol aumenta-se tanto a sua produtividade como o seu rendimento (11). Deste modo, o facto de poder ocorrer reassimilação de etanol enfatiza a importância da otimização das condições de arejamento na fermentação com *S. stipitis*. Além disso, apoia ainda a realização de um processo com dois estágios de arejamento, pois dessa forma minimiza-se a perda de etanol por reassimilação durante o estágio de produção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. HSSL

O HSSL, resultante do cozimento ao sulfito ácido de *Eucalyptus globulus*, foi fornecido pela Caima-Indústria de Celulose, S.A (Constância, Portugal), tendo sido recolhido à saída do efeito número 7 de uma série de sete evaporadores (Figura 2.3), de modo a evitar a presença de SO₂ livre, e a reduzir a concentração de furfural e de ácido acético. Antes de ser utilizado nas fermentações, o HSSL foi sujeito a um pré-tratamento (56). Este pré-tratamento iniciou-se por ajuste do valor de pH a 7,0 com KOH (Eka[®]), tendo-se deixado de seguida o HSSL repousar durante a noite a 4 °C, de modo a permitir a precipitação de compostos prejudiciais ao crescimento microbiano. Posteriormente, o HSSL foi arejado com ar comprimido, 12 h por litro de HSSL, com vista a oxidar os compostos prejudiciais ao crescimento microbiano, e assim facilitar a sua precipitação sob a forma de coloides. Por fim, de modo a separar os coloides precipitados, o HSSL foi centrifugado a 4500 rpm durante 0,5 h a 4 °C (Thermo Scientific Heraeus[®] Megafuge[®] 16R) e o sobrenadante foi recolhido e filtrado utilizando membranas de fibra de vidro com um diâmetro de poro de 1,2 µm (Specanalítica GF/C). Após o pré-tratamento, o HSSL foi armazenado esterilmente a 4 °C.

3.2. Microrganismo

A levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, fornecida pelo Agricultural Research Service Culture Collection no National Center for Agricultural Utilization Research, USDA, foi adaptada ao HSSL, como descrito por Pereira *et al.* (2015) (121). Da população de células adaptadas foi isolada a estirpe *S. stipitis* C4 (121), sendo esta a estirpe utilizada em todas as fermentações realizadas neste trabalho. A estirpe *S. stipitis* C4 foi conservada a 4 °C em meio YM_{xy1} (meio *Yeast Mold* suplementado com xilose) sólido, tendo sido repicada mensalmente.

3.3. Meios de cultura

O meio YM_{xyI} sólido foi preparado em água destilada com a seguinte composição: 3,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Oxoid®); 3,0 g.L⁻¹ de extrato de malte (Fluka®); 10,0 g.L⁻¹ de glucose (Scharlau®); 40,0 g.L⁻¹ de xilose (Sigma-Aldrich®) e 2,0% (m/v) de agar (Iberagar). De modo a evitar a degradação dos açúcares durante a esterilização, o meio YM_{xyI} sólido foi preparado em duas soluções separadas: uma contendo o extrato de levedura, o extrato de malte e o agar; e outra contendo a glucose e a xilose. O pH de ambas as soluções foi ajustado a 5,5.

O meio sintético, que mimetizou as concentrações de açúcares do HSSL, foi preparado em água destilada com a seguinte composição: 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Oxoid®), 2,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ (Panreac®), 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ (Pronalab®), 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O (Riedel-de Haën®), 50 mM de tampão hidrogenoftalato de potássio (142), 5,0 g.L⁻¹ de glucose (Scharlau®) e 40,0 g.L⁻¹ de xilose (Sigma-Aldrich®). De modo a evitar a precipitação de sais e a degradação dos açúcares durante a esterilização, o meio sintético foi preparado em cinco soluções separadas: uma solução tampão contendo o hidrogenoftalato de potássio (Panreac®) e o KOH (Eka®), na qual o pH foi ajustado a 5,5; outra contendo o extrato de levedura; outra contendo o MgSO₄·7H₂O; outra contendo o (NH₄)₂HPO₄ e o (NH₄)₂SO₄; e outra contendo a glucose e a xilose.

3.4. Fermentações

3.4.1 Pré-inóculos e inóculos

Os pré-inóculos foram preparados por transferência de uma colônia de *S. stipitis* C4 de meio de manutenção YM_{xyI} sólido para meio sintético, seguida de incubação a 28,0 ± 0,5 °C, com agitação orbital de 180 rpm (B. Braun® Certomat® S), durante 24 h. Findo este período, foram preparados os inóculos por transferência para meio sintético fresco do volume adequado de pré-inóculo, de modo a obter, uma densidade ótica inicial a 620 nm de 0,4. Os inóculos foram incubados a 28,0 ± 0,5 °C, com agitação orbital de 180 rpm (B. Braun® Certomat® S), durante 24 h, sendo depois utilizados na inoculação das fermentações. Para as fermentações em Erlenmeyer, os pré-inóculos foram preparados em tubo de Falcon® (Corning®) de 50 mL com 10 mL de meio sintético, e os inóculos, em Erlenmeyer de 100 mL com 40 mL de meio sintético. Para as fermentações em biorreator,

os pré-inóculos foram preparados em Erlenmeyer de 100 mL com 40 mL de meio sintético, e os inóculos, em Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio sintético.

3.4.2 Ensaios em Erlenmeyer

Os ensaios em Erlenmeyer foram realizados em descontínuo, em Erlenmeyers de 250 mL com um volume útil de 100 mL, de modo a obter um rácio de 2,5 entre o volume total e o volume útil (139). O meio de fermentação foi inoculado por transferência do volume adequado de inóculo, de modo a obter uma densidade ótica inicial a 620 nm de 0,4. Depois da inoculação, os ensaios foram incubados a $28,0 \pm 0,5$ °C, com agitação orbital de 180 rpm (B. Braun® Certomat® S), e foram recolhidas amostras ao longo do tempo para monitorização da biomassa, dos açúcares, dos produtos e do pH.

Foram realizados três ensaios em Erlenmeyer: um com meio sintético; outro com HSSL, e outro com 60% HSSL/40% meio sintético (v/v). Todos os ensaios foram realizados em duplicado. Deste modo, as concentrações dos produtos e dos substratos e os parâmetros cinéticos e estequiométricos apresentados correspondem à média e ao desvio padrão dos valores obtidos nos duplicados de cada ensaio.

3.4.3 Ensaios em biorreator

Os ensaios em biorreator foram realizados em descontínuo, num biorreator Biostat® Aplus de 5 L (Sartorius Stedim Biotech®) com controlo automático de temperatura, pH e tensão de oxigénio dissolvido, DOT (%), através do *software* micro-DCU (Sartorius Stedim Systems®), sendo os dados destas variáveis adquiridos pelo sistema MFCS/DA 3.0 (Sartorius Stedim Systems®). O volume útil foi de 3 L e o meio de fermentação foi inoculado através da transferência do volume adequado de inóculo, de modo a obter uma densidade ótica inicial a 620 nm de 0,4. A temperatura foi mantida a 28 °C e o pH, medido através do eletrodo EasyFerm® Plus K8 325 (Hamilton®), foi controlado a 5,5 (143) através da adição de KOH (5 M) e de H₂SO₄ (1 M). Por sua vez, a DOT foi medida através do eletrodo OxyFerm® FDA 325 (Hamilton®), o qual foi calibrado à pressão atmosférica, após a esterilização e em meio de fermentação, definindo o valor de DOT 0 e 100% através da aspersão do meio, respetivamente, com azoto e ar comprimido. Deste modo, a DOT medida exprime assim a percentagem de oxigénio dissolvido relativamente à saturação do meio com ar. A DOT foi controlada, conforme o pretendido em cada ensaio, através da

variação do caudal de ar e da velocidade de agitação entre 150 e 450 rpm. A agitação foi obtida por uma turbina de Rushton de seis pás, a 3 cm do dispersor em anel, e por quatro defletores. Sempre que necessário foi ainda adicionado anti-espuma (10%, v/v) (BDH[®] Prolabo[®] Antifoam Silicone 426 R). A biomassa, os açúcares, e os produtos foram monitorizados ao longo do tempo pela recolha de amostras.

Os ensaios realizados em biorreator foram divididos em ensaios com um único estágio de arejamento, nos quais a DOT foi controlada num valor definido durante toda a fermentação, e ensaios com dois estágios de arejamento, nos quais, no primeiro estágio se controlou a DOT num valor definido, e no segundo estágio, ou se fixou um determinado valor de caudal de ar e de velocidade de agitação, ou se definiu outro valor de DOT. As condições de arejamento dos ensaios em biorreator com meio sintético e com 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) são apresentadas na Tabela 3.1. Nos ensaios em meio sintético com dois estágios de arejamento, a mudança de estágio ocorreu quando se atingiu uma densidade ótica a 620 nm de cerca de 14, e no ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com dois estágios de arejamento, a mudança de estágio ocorreu quando se atingiu uma densidade ótica a 620 nm de cerca de 20.

Tabela 3.1 – Condições de arejamento dos ensaios em biorreator com meio sintético e com 60% HSSL/40% meio sintético (v/v).

Meio fermentativo	Ensaio com um único estágio de arejamento	Ensaio com dois estágios de arejamento	
		1º Estágio	2º Estágio
Meio sintético	DOT 1%	DOT 5%	0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm
	DOT 2,5%	DOT 25%	0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm
	DOT 5%	DOT 50%	0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm
	DOT 50%	DOT 50%	50 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 150 rpm
		DOT 50%	DOT 1%
60% HSSL/40% meio sintético (v/v)		DOT 50%	0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm

3.5. Esterilização e assepsia

Todas as soluções e materiais utilizados foram esterilizados em autoclave (AJC[®] Uniclave 88) a 121 °C durante 21 minutos. Para além disso, de modo a manter as condições de assepsia, todos os procedimentos foram realizados à chama na câmara de fluxo laminar (BBH4 Braun Horizontal), exceto a recolha de amostras do biorreator, a qual

foi realizada através de sucção por uma seringa com um filtro de 0,2 µm, para evitar a entrada de ar não estéril no biorreator e assim, garantir a manutenção das condições de assepsia. No final das fermentações, a biomassa obtida foi plaqueada de modo a verificar a ausência de contaminações da cultura.

3.6. Métodos analíticos

3.6.1 Quantificação da biomassa

A concentração de biomassa foi monitorizada ao longo das fermentações através da medição da densidade ótica a 620 nm (Shimadzu[®] UVmini-1240[®]) e sua subsequente conversão em concentração através da curva de calibração de densidade ótica versus peso seco. O peso seco foi determinado no final das fermentações por filtração de 5,00 mL de amostra em quadruplicado, utilizando membranas com um diâmetro de poro de 0,45 µm (Whatman[®] ME 25/21 ST). Após a filtração a biomassa retida no filtro foi lavada com 15,00 mL de água destilada e depois seca a 105 °C até se obter peso constante (121).

3.6.2 pH

O pH das amostras das fermentações em Erlenmeyer foi determinado usando um medidor de bancada (Consort[®] C833) equipado com um eletrodo de pH (Sentek[®] P11/HA).

3.6.3 Quantificação da glucose, xilose, ácido acético, xilitol e etanol

A concentração de glucose, xilose, ácido acético, xilitol e etanol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Primeiramente, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm ($11337 \times g$) durante 2 min (Eppendorf[®] MiniSpin[®]) para separar a biomassa, e de seguida o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20 °C. Antes de ser injetado em HPLC, 650 µL de sobrenadante foram filtrados por centrifugação a 8000 rpm ($4293 \times g$) (Eppendorf[®] MiniSpin[®]) usando filtros de tubos de centrífuga CoStar[®] Spin-X[®] (Corning[®]) de nylon com um diâmetro de poro de 0,22 µm, tendo-se de seguida adicionado 50 µL de H₂SO₄ (0,5 M), de modo a que o pH se situasse num valor entre 1 e 3. Posteriormente, 20 µL de filtrado foram injetados no sistema de HPLC LaChrom Elite[®] (VWR[®]-Hitachi) equipado com injetor automático L-2200 (VWR-Hitachi), bomba L-2130 (VWR[®]-Hitachi), forno Gecko 2000[®] (Cluzeau Info Labo) a 40 ± 1 °C, detetor de índice de refração L-2490 (VWR-Hitachi) e sistema de aquisição e

tratamento de dados EZChrom Elite[®] (Agilent Technologies[®]). Na análise cromatográfica utilizou-se uma coluna Aminex[®] HPX-87H (BIO-RAD[®]) de 300 × 7,8 mm, composta por uma resina reticulada na forma protonada com um tamanho de partícula de 9 µm e um grau de reticulação de 8%. A eluição foi realizada em regime isocrático usando como fase móvel H₂SO₄ (0,01 N) a um caudal de 0,6 mL.min⁻¹. A concentração de todos os compostos analisados foi determinada com base em curvas de calibração da área do pico do composto versos a concentração do respetivo padrão.

3.7. Cálculos

3.7.1 Coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio (K_La)

O K_La foi determinado em meio sintético pelo método estático da desgaseificação (144). Assim, após se preparar o biorreator do mesmo modo que para a fermentação mas sem o inocular, procedeu-se à desgaseificação do meio com azoto e, de seguida, foi definida a velocidade de agitação de 150 rpm e foi fornecido ao biorreator um caudal de ar de 50 mL.min⁻¹, monitorizando-se e registando-se então os valores de DOT ao longo do tempo.

A variação da concentração de oxigénio dissolvido, C_{O_2} (mol.m⁻³), ao longo do tempo, t (h), é descrita pela equação (3.1),

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = K_La(C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (3.1)$$

onde $C_{O_2}^*$ (mol.m⁻³) corresponde à concentração de saturação de oxigénio dissolvido. Assim, pela integração da equação (3.1) obteve-se a reta $\ln(C_{O_2}^* - C_{O_2})$ versus t , cujo o declive corresponde a $-K_La$ (12).

3.7.2 Parâmetros cinéticos e estequiométricos

A taxa específica de crescimento máxima, μ_{max} (h⁻¹), foi obtida na fase exponencial do crescimento celular pelo declive da reta de \ln (Biomassa) versus t (12). A taxa específica de crescimento máxima em função da DOT, μ_{MAX} (h⁻¹), e a constante de saturação em relação ao oxigénio, K_{O_2} (%), foram obtidas por regressão não linear através do ajuste da equação cinética de Monod (3.2) (12) aos dados experimentais de μ_{max} (h⁻¹) versus DOT (%), com recurso ao *software* GraphPad Prism[®] 5.

$$\mu_{max} = \frac{\mu_{MAX} \text{ DOT}}{K_{O_2} + \text{DOT}} \quad (3.2)$$

A taxa volumétrica de consumo de glucose, $r_{glucose}$ (g.L⁻¹.h⁻¹), a taxa volumétrica de consumo de xilose, r_{xilose} (g.L⁻¹.h⁻¹), a taxa volumétrica de consumo de ácido acético, $r_{ácido\ acético}$ (g.L⁻¹.h⁻¹), a taxa volumétrica de produção de xilitol, $r_{xilitol}$ (g.L⁻¹.h⁻¹), e a taxa volumétrica de produção de etanol, r_{etanol} (g.L⁻¹.h⁻¹), foram calculadas pela equação (3.3):

$$r_C = \frac{\Delta[C]}{\Delta t} \quad (3.3)$$

onde, C representa a concentração de glucose, xilose, ácido acético, xilitol e etanol, respetivamente, para a $r_{glucose}$, a r_{xilose} , a $r_{ácido\ acético}$, a $r_{xilitol}$ e a r_{etanol} (12). Por sua vez, o rendimento em biomassa, $Y_{biomassa/substrato}$ (g.g⁻¹), o rendimento em etanol, $Y_{etanol/substrato}$ (g.g⁻¹), e o rendimento em xilitol, $Y_{xilitol/xilose}$ (g.g⁻¹), foram calculados, respetivamente, pelas equações (3.4), (3.5) e (3.6) (12):

$$Y_{biomassa/substrato} = \frac{\Delta[biomassa]}{\Delta[substrato]} \quad (3.4)$$

$$Y_{etanol/substrato} = \frac{\Delta[etanol]}{\Delta[substrato]} \quad (3.5)$$

$$Y_{xilitol/xilose} = \frac{\Delta[xilitol]}{\Delta[xilose]} \quad (3.6)$$

Para o $Y_{biomassa/substrato}$, em meio sintético considerou-se como substrato a glucose e a xilose, e em 60% HSSL/40% meio sintético considerou-se como substrato a glucose, a xilose e o ácido acético. Por sua vez, para o $Y_{etanol/substrato}$ considerou-se como substrato, tanto em meio sintético como em 60% HSSL/40% meio sintético, apenas a glucose e a xilose. Por fim, dado o rendimento teórico em etanol ser de 0,51 g.g⁻¹, calculou-se a eficiência de conversão (%) pela equação (3.7):

$$Eficiência\ de\ conversão\ (\%) = \frac{Y_{etanol/substrato}}{0,51} \times 100 \quad (3.7)$$

A $r_{glucose}$ e a $r_{ácido\ acético}$ foram calculadas desde o início da fermentação até ao ponto em que, respetivamente, a glucose e o ácido acético se esgotaram. A r_{xilose} , para o primeiro estágio de arejamento, foi calculada desde o início da fermentação até ao fim desse estágio, para o segundo estágio de arejamento, foi calculada desde o ponto da mudança de estágio até ao ponto em que a xilose se esgotou e, para toda a fermentação, foi calculada desde o início da fermentação até ao ponto em que a xilose se esgotou. Porém, nas fermentações

em que a xilose não se esgotou, a r_{xilose} , tanto do segundo estágio de arejamento como de toda a fermentação, foi calculada até ao último ponto da fermentação. O $Y_{biomassa/substrato}$, para o primeiro estágio de arejamento, foi calculado desde o início da fermentação até ao fim desse estágio, para o segundo estágio de arejamento, foi calculado desde a mudança de estágio até ao ponto em que se atingiu o máximo ou o patamar em etanol e, para toda a fermentação, foi calculado desde o início da fermentação até ao ponto em que se atingiu o máximo ou o patamar em etanol. Todavia, nas fermentações em que não se produziu etanol o $Y_{biomassa/substrato}$ foi calculado até ao ponto em que a xilose se esgotou ou, em caso de a xilose não se ter esgotado, até ao ponto final da fermentação. Por fim, a r_{etanol} , a $r_{xilitol}$, o $Y_{etanol/substrato}$ e o $Y_{xilitol/xilose}$, para o segundo estágio de arejamento, foram calculados desde o ponto da mudança de estágio até ao ponto em que se atingiu o máximo ou o patamar em etanol e, para toda a fermentação, foram calculados desde o início da fermentação até ao ponto em que se atingiu o máximo ou o patamar em etanol.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaios em Erlenmeyer

Nos ensaios em Erlenmeyer procurou-se caracterizar o crescimento e a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* C4 em meio sintético e em licor de cozimento ao sulfito ácido de *Eucalyptus globulus* (HSSL). Deste modo, foi realizado um ensaio com meio sintético, outro com HSSL e outro com 60% HSSL/40% meio sintético (v/v). O meio sintético foi preparado de modo a mimetizar as concentrações de açúcares do HSSL, 5 g.L⁻¹ de glucose e 40 g.L⁻¹ de xilose, e assim todos os ensaios foram realizados com a mesma concentração inicial de açúcares.

No ensaio em meio sintético (Figura 4.1) verificou-se a completa exaustão tanto da glucose como da xilose. No entanto, o consumo de xilose só se iniciou quando a glucose se esgotou, o que corresponde ao típico consumo sequencial destes açúcares por *S. stipitis*, resultante da repressão catabólica do consumo de xilose pela glucose (100, 103, 104, 145). Todavia, contrariamente ao observado por Sánchez *et al.* (2002), não se observou a interrupção do crescimento na transição da glucose para a xilose (104). A eliminação da fase lag diáuxica na transição da glucose para a xilose deve-se, como foi demonstrado por Slininger *et al.* (2011), ao facto da levedura ter crescido previamente num inóculo contendo xilose (105). A concentração de etanol atingiu o seu máximo (14,4 g.L⁻¹) quando a xilose se esgotou, o que indica que o fim da produção de etanol se deveu à exaustão do substrato. Após a xilose se esgotar, o crescimento cessou, a concentração de etanol diminuiu e observou-se o aumento da concentração de ácido acético. A diminuição da concentração de etanol deveu-se à sua reassimilação pela levedura. Com efeito, Skoog *et al.* (1992) mostraram que a *S. stipitis* consegue reassimilar o etanol e oxidá-lo a acetato, o qual pode acumular-se intracelularmente, pode ser excretado, ou pode ainda ser oxidado através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (141). Deste modo, o aumento da concentração de ácido acético após o máximo de etanol resulta da excreção do acetato para o meio

extracelular. Entre o início da fermentação e o ponto em que se atingiu o máximo de etanol, verificou-se ainda que, apesar do meio ter sido tamponado com hidrogenofteralato de potássio (50 mM), o pH diminuiu de 6,74 para 4,29, o que indica que a concentração de tampão não foi suficientemente elevada. Durante todo o ensaio não se observou qualquer produção de xilitol, o que indica que a produção de etanol não foi limitada pela regeneração do NAD^+ necessário para a conversão do xilitol em xilulose (Figura 2.4) (99).

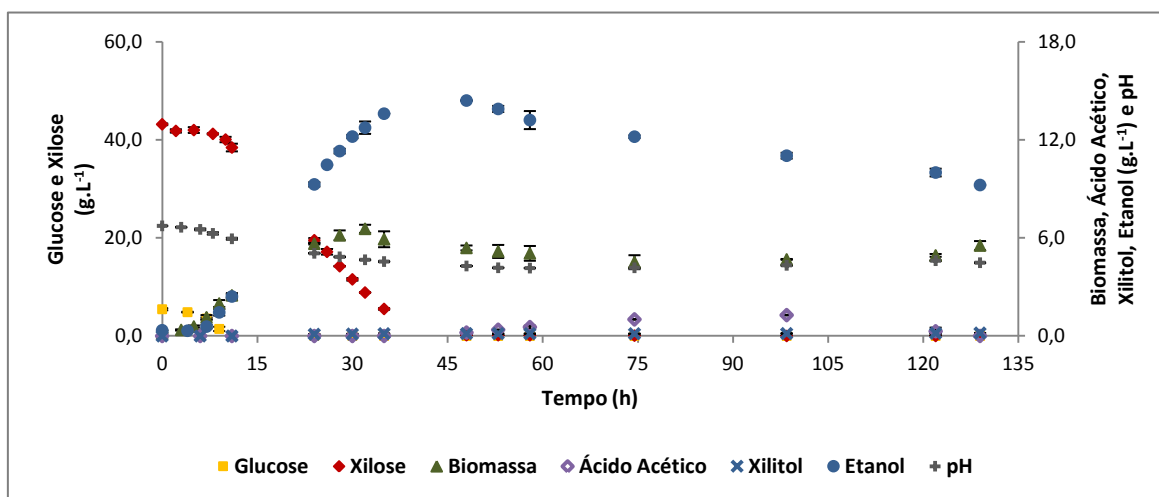


Figura 4.1 – Ensaio em Erlenmeyer com meio sintético.

Os parâmetros cinéticos e estequiométricos do ensaio com meio sintético são apresentados na Tabela 4.1. Neste ensaio, a taxa volumétrica de consumo de glucose, $r_{glucose}$, e a taxa volumétrica de consumo de xilose, r_{xilose} , foram respetivamente de $0,494 \pm 0,016$ e $0,896 \pm 0,004 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, e a taxa específica de crescimento máxima, μ_{max} , foi de $0,310 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$. Por sua vez, a taxa volumétrica de produção de etanol, r_{etanol} , foi de $0,293 \pm 0,0004 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e o rendimento em etanol, $Y_{etanol/substrato}$, foi de $0,290 \pm 0,001 \text{ g.g}^{-1}$, o que correspondeu a uma eficiência de conversão de $56,7 \pm 0,1\%$. Xavier *et al.* (2010), utilizando um meio não tamponado idêntico ao meio sintético, com uma concentração de glucose e xilose respetivamente de 2,0 e 20,0 g.L^{-1} , obtiveram em Erlenmeyer para a estirpe *S. stipitis* NRRL Y-7124 uma μ_{max} de $0,37 \text{ h}^{-1}$, uma r_{etanol} de $0,77 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e um $Y_{etanol/substrato}$ de $0,37 \text{ g.g}^{-1}$ (56). Estes três parâmetros foram superiores aos obtidos neste trabalho para a *S. stipitis* C4. O maior $Y_{etanol/substrato}$ obtido por Xavier *et al.* (2010) pode ser explicado em parte pela diferença nos rácios entre o volume total e o volume útil utilizado por estes autores ($2,0 V_{total} \cdot V_{útil}^{-1}$) e neste trabalho ($2,5 V_{total} \cdot V_{útil}^{-1}$), pois a diminuição do rácio entre o volume total e o volume útil reduz a disponibilidade de oxigénio, favorecendo

assim o rendimento em etanol (139). No entanto, deve-se ter também em conta que as estirpes utilizadas no presente trabalho e por Xavier *et al.* (2010) também são diferentes.

Tabela 4.1 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos do ensaio em Erlenmeyer com meio sintético.

	Ensaio em Erlenmeyer com meio sintético
μ_{max} (h ⁻¹)	0,310 ± 0,004
[Etanol] _{max} (g.L ⁻¹)	14,4 ± 0,02
$r_{glucose}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,494 ± 0,016
r_{xilose} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,896 ± 0,004
r_{etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,293 ± 0,0004
$Y_{biomassa/substrato}$ (g.g ⁻¹)	0,108 ± 0,003
$Y_{etanol/substrato}$ (g.g ⁻¹)	0,290 ± 0,001
Eficiência de Conversão (%)	56,7 ± 0,1

Ao contrário do observado no ensaio em meio sintético (Figura 4.1), no ensaio em HSSL (Figura 4.2) não se verificou qualquer crescimento da *S. stipitis* C4, o que provavelmente se deveu ao elevado conteúdo em inibidores do HSSL (56, 77, 146). Assim, de modo a reduzir a concentração de inibidores do HSSL, foi realizado um terceiro ensaio com 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) (Figura 4.3), contudo, ao fim de 130 h de incubação, continuou a não se verificar qualquer crescimento da *S. stipitis* C4. Atendendo à descrição da composição química do HSSL apresentada por Marques *et al.* (2009), Xavier *et al.* (2010) e Fernandes *et al.* (2012), a inibição do crescimento da *S. stipitis* C4 em ambos os ensaios com HSSL, pode ser atribuída aos lenhosulfunatos, aos compostos fenólicos de baixo peso molecular e ao ácido acético, os quais constituem os principais inibidores do HSSL (56, 77, 146). Estes compostos inibem o crescimento por diversos mecanismos, enquanto os compostos fenólicos são responsáveis pela perda da integridade das membranas celulares (70) e pela inibição da síntese de aminoácidos (118), o ácido acético é responsável pela acidificação do citoplasma (70, 111). Para além disso, vários autores têm demonstrado ainda que quando combinados, a toxicidade destes inibidores é superior à resultante da soma das toxicidades de cada um (114, 115, 117). No entanto, apesar do elevado conteúdo em inibidores do HSSL, Pereira *et al.* (2015), também utilizando a *S. stipitis* C4, obtiveram em Erlenmeyer uma μ_{max} de 0,17 h⁻¹ na fermentação de 60% HSSL (v/v) (121). Este resultado pode ser explicado em parte pelo elevado rácio entre o volume total e o volume útil utilizado por estes autores (10 V_{total}·V_{útil}⁻¹). Contudo, a

μ_{max} obtida também pode estar associada a um menor conteúdo em inibidores do HSSL utilizado por Pereira *et al.* (2015) relativamente ao utilizado neste trabalho, pois como se trata de um subproduto industrial podem ocorrer variações no seu perfil de concentrações.

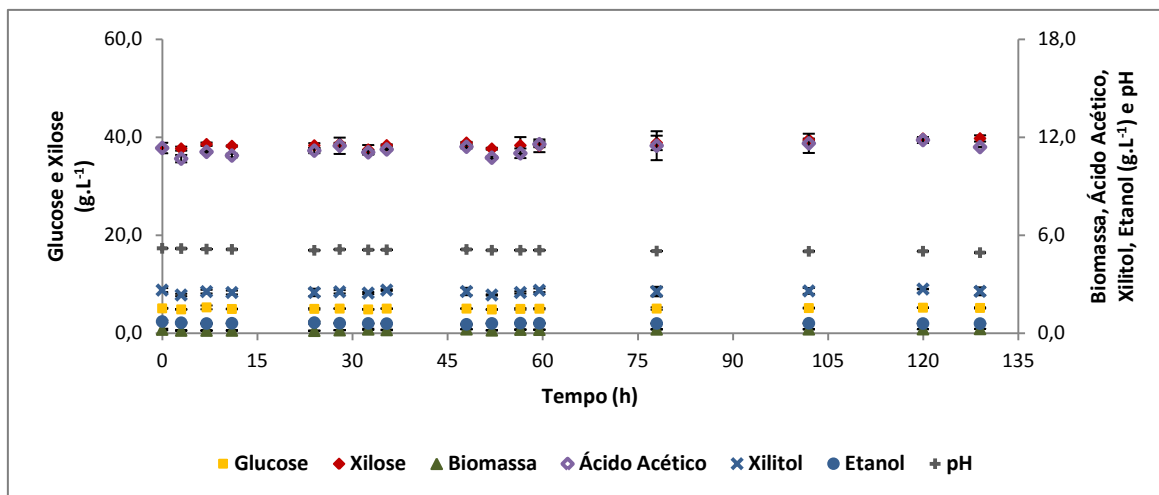


Figura 4.2 – Ensaio em Erlenmeyer com HSSL.

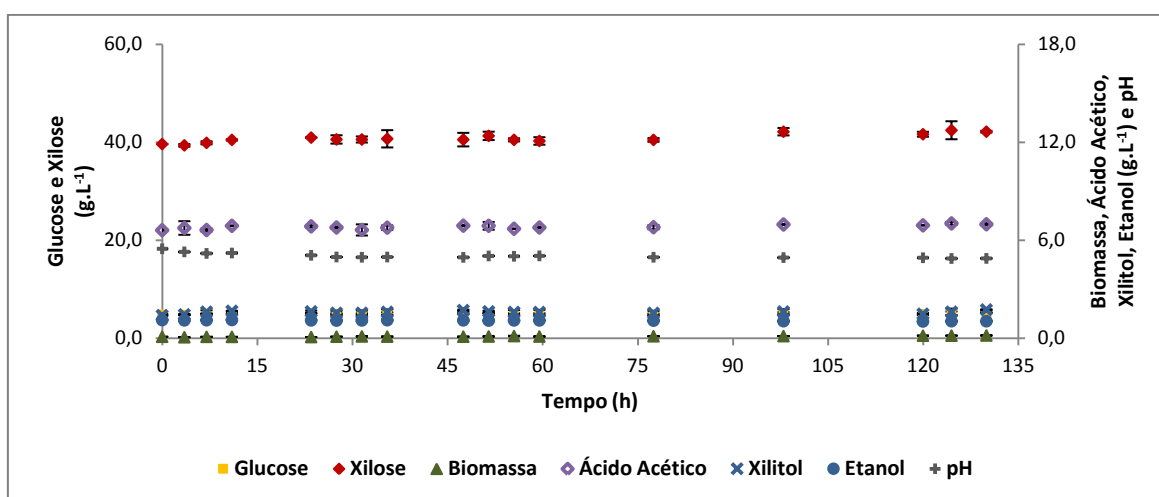


Figura 4.3 – Ensaio em Erlenmeyer com 60% HSSL/40% meio sintético (v/v).

O ensaio em meio sintético demonstrou o elevado potencial da *S. stipitis* C4 na conversão dos açúcares do HSSL a etanol. Contudo, os ensaios com HSSL mostraram que o estabelecimento de uma boa estratégia de arejamento para a fermentação do HSSL deve ter em conta, não só a eficiente conversão dos açúcares a etanol, mas também o estímulo do crescimento da *S. stipitis* C4.

4.2. Ensaios em biorreator

Nos ensaios em biorreator, com controlo de pH, temperatura e tensão de oxigénio dissolvido, DOT (%), foram estudadas em meio sintético duas estratégias de arejamento: uma com apenas um único estágio de arejamento, na qual a DOT foi controlada num determinado valor durante toda a fermentação; e outra com dois estágios de arejamento, na qual no primeiro estágio se controlou a DOT num determinado valor, e no segundo estágio, ou se fixou um determinado valor de caudal de ar e de velocidade de agitação, ou se definiu outro valor de DOT. Por fim, a melhor estratégia foi aplicada ao HSSL. A DOT, que expressa a percentagem de saturação em oxigénio do meio fermentativo, foi controlada através da variação do caudal de ar e da velocidade de agitação.

4.2.1 Ensaios com um único estágio de arejamento

Na estratégia com um único estágio de arejamento estudaram-se em meio sintético os seguintes valores de DOT: 1% (Figura 4.4); 2,5% (Figura 4.5); 5% (Figura 4.6) e 50% (Figura 4.7). Independentemente do valor de DOT verificou-se, tal como no ensaio em Erlenmeyer (Figura 4.1), que o consumo de xilose só se iniciou após a glucose se esgotar, o que mostra que a repressão catabólica do consumo de xilose pela glucose é independente da concentração de oxigénio dissolvido. Do mesmo modo, vários autores têm demonstrado que independentemente das condições de arejamento utilizadas a glucose e a xilose são consumidas sequencialmente (11, 133, 135). No entanto, verificou-se que tanto a $r_{glucose}$ como a r_{xilose} aumentaram com a utilização de uma maior DOT, registando-se um aumento respetivamente de 5,5 e 1,8 vezes entre os ensaios com DOT de 1% e com DOT de 50%. Para além disso, verificou-se ainda que a utilização de uma maior DOT também permitiu aumentar a μ_{max} , registando-se um aumento de 1,6 vezes entre os ensaios com DOT de 1% e com DOT de 50% (Tabela 4.2). Este aumento da μ_{max} resultou, provavelmente, do maior fluxo metabólico através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos devido à maior disponibilidade de oxigénio (147). De facto, na literatura o aumento da μ_{max} com o aumento da disponibilidade de oxigénio encontra-se bem documentado (11, 129-133, 140). Todavia, no ensaio com DOT de 50% (Figura 4.7) verificou-se a cessação do crescimento e a drástica redução do consumo de xilose quando ainda restavam no meio 19,6 g.L⁻¹ de xilose. Esta interrupção do crescimento pode ser atribuída ao efeito de Pasteur, no qual quando existe uma elevada disponibilidade de oxigénio no meio ocorre a redução do consumo de

açúcares, devido à inibição do seu transporte pelo oxigénio (126). Com efeito, Silva *et al.* (2012) verificaram que com elevados valores de coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio (K_La), 58,0 e 65,8 h⁻¹, o crescimento da *S. stipitis* entrava em fase estacionária quando ainda restavam no meio cerca de 40% dos açúcares (11).

Em nenhum dos ensaios realizados com um único estágio de arejamento se observou a produção de etanol, nem mesmo no ensaio com DOT de 1%, a qual corresponde a um valor próximo do limite de deteção do elétrodo de oxigénio. du Preez *et al.* (1989) obtiveram, para a *S. stipitis*, o melhor rendimento em etanol com um valor de DOT de 0%, e a melhor produtividade com o controlo da DOT a 0,7% (140), o que indica que os melhores valores de DOT para a produção de etanol por *S. stipitis* se encontram abaixo de 1%. De facto, vários estudos com *S. stipitis* sem controlo da DOT referem que, independentemente da taxa de transferência de oxigénio (*OTR*) testada, a DOT atinge rapidamente o valor de 0% após o início da fermentação, o que mostra que todo o oxigénio transferido para o meio fermentativo é consumido pela *S. stipitis* (130, 131, 135, 148, 149). Deste modo, a ausência de produção de etanol em todos os valores de DOT testados neste trabalho é explicada pelo facto da *S. stipitis* C4 nunca ter estado sob limitação de oxigénio, pois, com vista à manutenção do valor definido de DOT, foi sempre fornecido oxigénio de modo a satisfazer o seu consumo pela levedura. Por outro lado, também não se verificou a produção de xilitol em nenhum dos valores de DOT testados, pois como a estirpe *S. stipitis* C4 nunca esteve sob limitação de oxigénio, manteve sempre o equilíbrio entre o NADH e o NAD⁺ (Figura 2.4). Do mesmo modo, du Preez *et al.* (1989) também não observaram a acumulação de xilitol nas fermentações com controlo de DOT (140).

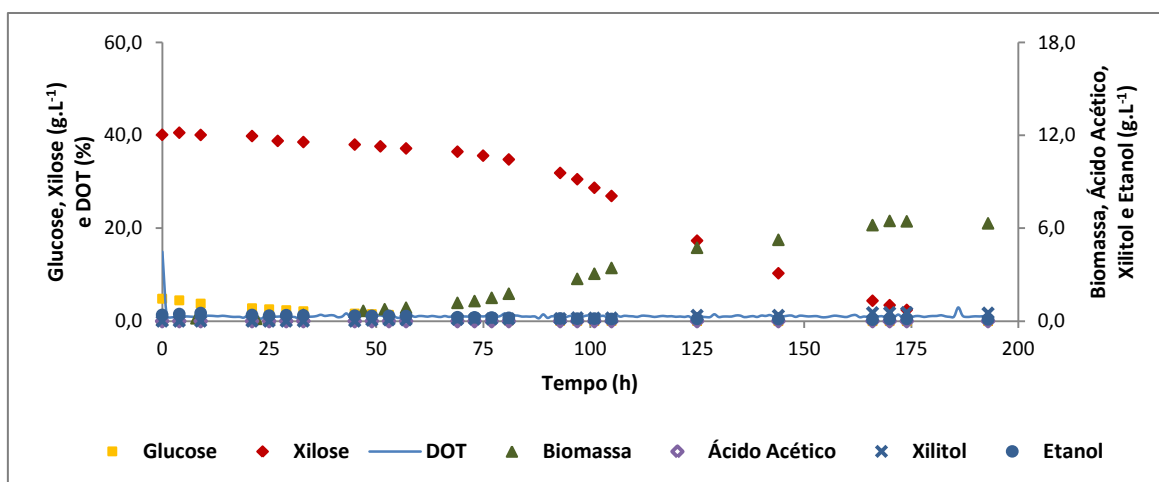


Figura 4.4 – Ensaio em meio sintético com um único estágio de arejamento com controlo da DOT a 1% ao longo de toda a fermentação.

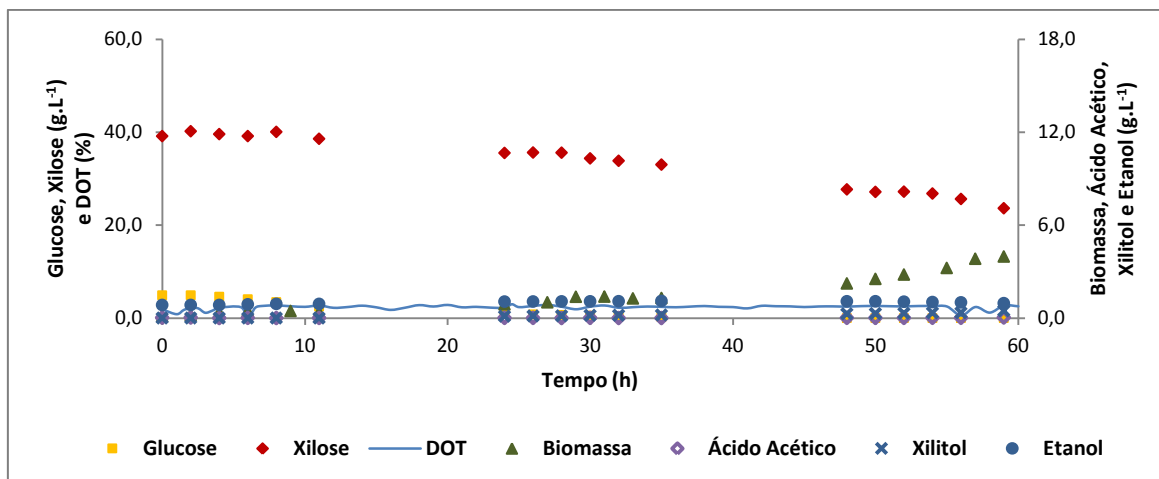


Figura 4.5 – Ensaio em meio sintético com um único estágio de arejamento com controle da DOT a 2,5% ao longo de toda a fermentação.

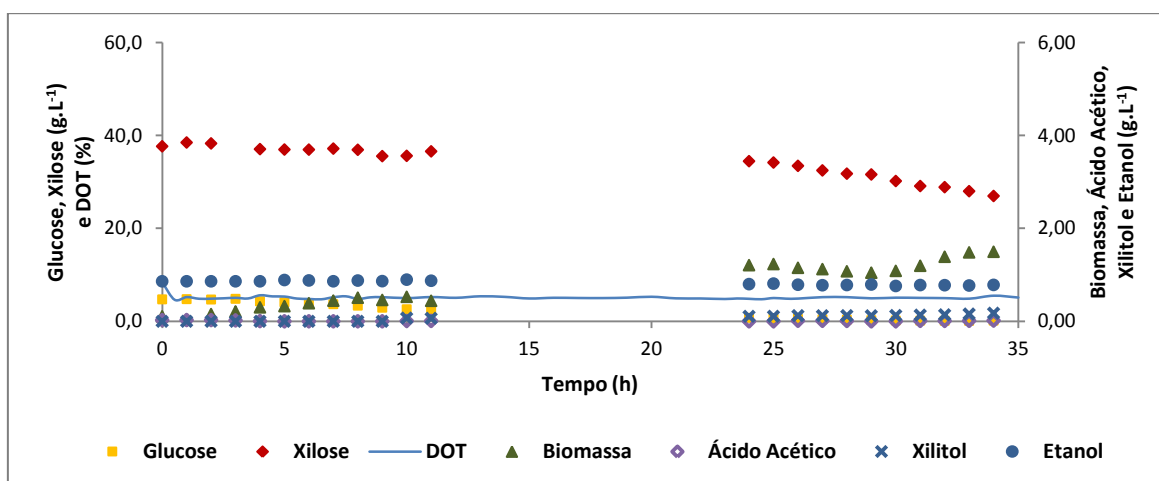


Figura 4.6 – Ensaio em meio sintético com um único estágio de arejamento com controle da DOT a 5% ao longo de toda a fermentação.

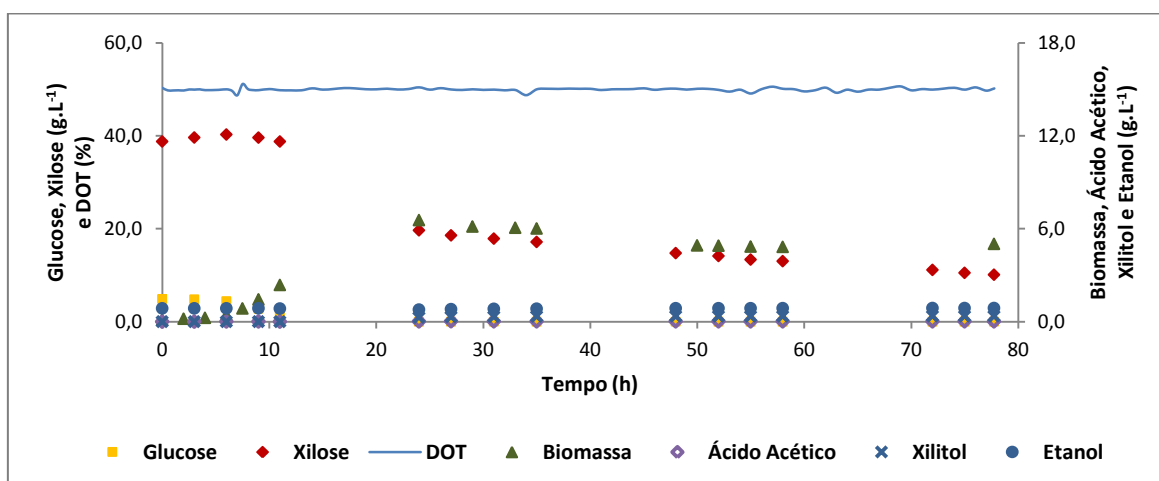


Figura 4.7 – Ensaio em meio sintético com um único estágio de arejamento com controle da DOT a 50% ao longo de toda a fermentação.

4. Resultados e Discussão

Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos dos ensaios em meio sintético com um único estágio de arejamento.

	DOT 1%	DOT 2,5%	DOT 5%	DOT 50%
μ_{max} (h ⁻¹)	0,28	0,33	0,34	0,44
$r_{glucose}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,06	0,13	0,14	0,33
r_{xilose} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,21	0,26	0,31	0,37
$Y_{biomassa/substrato}$ (g.g ⁻¹)	0,14	0,19	0,09	0,15

O crescimento microbiano depende da concentração de oxigénio dissolvido no meio fermentativo e pode ser descrito pelo modelo cinético de Monod (4.1), que relaciona a μ_{max} (h⁻¹) com a DOT (%):

$$\mu_{max} = \frac{\mu_{MAX} DOT}{K_{O_2} + DOT} \quad (4.1)$$

onde, μ_{MAX} (h⁻¹) é a taxa específica de crescimento máxima em função da DOT e K_{O_2} (%) é a constante de saturação em relação ao oxigénio (12). Na Figura 4.8 é apresentado o ajuste do modelo cinético de Monod aos dados experimentais da μ_{max} versus DOT, tendo-se obtido uma μ_{MAX} de $0,43 \pm 0,02$ h⁻¹ e uma K_{O_2} de $0,65 \pm 0,19\%$, com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,87. A μ_{MAX} corresponde à taxa específica de crescimento máxima quando o sistema está saturado com oxigénio (12), deste modo, o valor de $0,43 \pm 0,02$ h⁻¹ corresponde, nas condições de cultivo em estudo, à maior taxa específica de crescimento que é possível obter com a *S. stipitis* C4 quando o crescimento não é limitado por oxigénio. Por sua vez, a K_{O_2} é um indicador da afinidade da *S. stipitis* C4 pelo oxigénio (12), deste modo, o valor de $0,65 \pm 0,19\%$ mostra que a *S. stipitis* C4 tem uma elevada afinidade pelo oxigénio, pois mesmo a uma DOT de $0,65 \pm 0,19\%$ é ainda possível obter metade da μ_{MAX} . Slininger *et al.* (1991) estudaram a variação da taxa específica de crescimento da *S. stipitis* em função da concentração de oxigénio dissolvido e obtiveram uma μ_{MAX} de $0,54$ h⁻¹ (150), a qual foi superior à obtida neste trabalho. Porém, a maior μ_{MAX} obtida por estes autores deve-se, provavelmente, ao facto do estudo ter sido conduzido em 40 g.L⁻¹ de xilose, em vez de 5 g.L⁻¹ de glucose e 40 g.L⁻¹ de xilose, pois a taxa específica de crescimento máxima depende tanto do substrato utilizado como da sua concentração (103, 145, 150, 151). No ensaio com DOT de 50% foi obtida uma μ_{max} de $0,44$ h⁻¹ (Tabela 4.2), o que indica que a DOT de 50% foi suficientemente elevada para obter a maior taxa específica de crescimento que é possível se alcançar nas condições de cultivo em estudo.

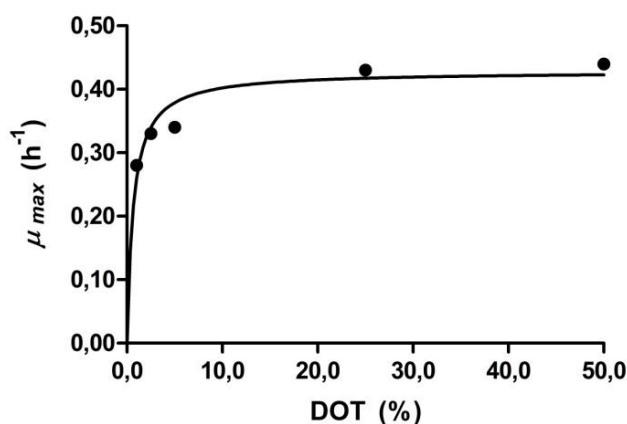


Figura 4.8 – Ajuste do modelo cinético de Monod aos dados experimentais de μ_{max} versus DOT com recurso ao *software* GraphPad Prism® 5. O valor de μ_{max} para a DOT de 25% foi obtido do ensaio em meio sintético com dois estágios de arejamento: DOT 25% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Tabela 4.3).

Nos ensaios com um único estágio de arejamento, apesar do controlo da DOT não ter permitido a produção de etanol, demonstrou-se, contudo, que uma DOT de 50% permite obter a maior taxa específica de crescimento máxima que é possível de se alcançar quando a cultura não é limitada pelo oxigénio. Deste modo, o controlo da DOT a 50% apresenta-se como uma estratégia promissora para o estímulo do crescimento da *S. stipitis* C4 em HSSL. Assim, a melhor estratégia de arejamento para a produção de etanol a partir do HSSL pode passar por um primeiro estágio com controlo da DOT, para o estímulo do crescimento, e um segundo com limitação de oxigénio, de modo a promover a produção de etanol.

4.2.2 Ensaio com dois estágios de arejamento

Na estratégia com dois estágios de arejamento, primeiro procurou-se estudar o impacto na fermentação do aumento da disponibilidade de oxigénio do primeiro estágio de arejamento. Desse modo, foram realizados os ensaios em meio sintético DOT 5% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.9), DOT 25% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.10), e DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.11), nos quais o segundo estágio de arejamento decorreu nos três ensaios com 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, variando-se apenas o valor de DOT do primeiro estágio. Após se estudar o impacto da utilização de um maior valor de DOT no primeiro estágio de arejamento, procurou-se estudar o efeito do aumento da disponibilidade de oxigénio do segundo estágio na produção de etanol. Desse modo, foram também realizados em meio sintético o ensaio DOT 50% - 50 mL_{Ar}.min⁻¹ e 150 rpm

(Figura 4.12) e o ensaio DOT 50% - DOT 1% (Figura 4.13), os quais, conjuntamente com o ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.11), permitiram comparar três formas diferentes de arejamento do segundo estágio. Em todos estes ensaios a mudança de estágio ocorreu quando se atingiu uma densidade ótica a 620 nm de cerca de 14.

4.2.2.1 Impacto do aumento da disponibilidade de oxigénio do primeiro estágio de arejamento

A utilização de um maior valor de DOT no primeiro estágio de arejamento dos ensaios DOT 5% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.9), DOT 25% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.10), e DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.11), permitiu, tal como nos ensaios com apenas um único estágio de arejamento, aumentar tanto a $r_{glucose}$ como a r_{xilose} do primeiro estágio (Tabela 4.3), verificando-se neste caso um aumento da $r_{glucose}$ e da r_{xilose} respetivamente de 6,4 e 1,5 vezes entre os ensaios com DOT de 5% e com DOT de 50% no primeiro estágio de arejamento. De igual modo, no primeiro estágio verificou-se também o aumento da μ_{max} , registando-se um aumento de 1,3 vezes entre os ensaios com DOT de 5% e com DOT de 50% no primeiro estágio de arejamento (Tabela 4.3). Deste modo, a utilização de um maior valor de DOT permitiu diminuir a duração do primeiro estágio de arejamento, pois foi possível atingir a densidade ótica de 14 num menor período de tempo. Para além disso, verificou-se ainda que a utilização de um maior valor de DOT permitiu aumentar também o rendimento em biomassa, $Y_{biomassa/substrato}$, no primeiro estágio, com este a aumentar de 0,19 para 0,78 g.g⁻¹ entre os ensaios com DOT de 5% e com DOT de 50% no primeiro estágio de arejamento (Tabela 4.3). O aumento do $Y_{biomassa/substrato}$ no primeiro estágio com a utilização de um maior valor de DOT constituiu uma grande vantagem para todo o processo, pois deste modo foi possível atingir uma elevada densidade celular com menor dispêndio de açúcares durante o primeiro estágio, o que permitiu assim que uma maior quantidade de açúcares estivesse disponível para a produção de etanol durante o segundo estágio de arejamento. Com efeito, a percentagem de açúcares consumidos no primeiro estágio de arejamento dos ensaios DOT 5% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, DOT 25% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, e DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, foi de 46,7, 42,7 e 16,9%, respetivamente (Tabela 4.3). De referir ainda que no decurso do primeiro estágio de arejamento do ensaio DOT 25% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.10) se verificou a redução da taxa de consumo de xilose das 14 para as 24 h. Esta

redução da taxa de consumo de xilose resultou, provavelmente, da inibição do transporte de xilose pelo oxigénio (11, 126), devido ao facto da cultura de *S. stipitis* C4 ter estado sujeita, por problemas técnicos, a uma de DOT de cerca de 50% durante este período de tempo.

A mudança do primeiro estágio de arejamento, com controlo da DOT, para o segundo estágio de arejamento, com 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, nos ensaios DOT 5% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.9), DOT 25% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.10), e DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.11), permitiu induzir a produção de etanol e reprimir o crescimento da *S. stipitis* C4 nos três ensaios. O estímulo da produção de etanol e a cessação do crescimento com a mudança de estágio resultou da diminuta disponibilidade de oxigénio existente durante o segundo estágio de arejamento, pois neste estágio a transferência de massa de oxigénio apenas decorreu através da superfície do meio fermentativo, levando assim a que a cultura ficasse sob limitação de oxigénio. A limitação de oxigénio estimula a produção de etanol e reprime o crescimento, pois leva à acumulação de NADH no meio intracelular, o que inibe a piruvato desidrogenase (PDH), responsável por conduzir o fluxo metabólico do carbono ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos, ficando assim o piruvato disponível para ser convertido pela piruvato descarboxilase (PDC), que conduz o fluxo metabólico do carbono à formação de etanol (Figura 2.5) (128). Com efeito, Passoth *et al.* (1996) verificaram que a passagem de uma DOT de 80% para condições de anaerobiose aumentava a atividade da PDC na *S. stipitis* (128). A indução da produção de etanol pela restrição de oxigénio permitiu obter no segundo estágio de arejamento dos ensaios DOT 5% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, DOT 25% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, e DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, um $Y_{\text{etanol/substrato}}$ de 0,41, 0,39 e 0,40 g.g⁻¹, respetivamente (Tabela 4.3). Estes resultados demonstram que os diferentes valores de DOT do primeiro estágio não influenciaram o $Y_{\text{etanol/substrato}}$ do segundo estágio de arejamento. Contudo, no segundo estágio destes três ensaios a r_{xilose} foi respetivamente de 0,18, 0,16, e 0,52 g.L⁻¹.h⁻¹, e a r_{etanol} foi respetivamente de 0,07, 0,06 e 0,21 g.L⁻¹.h⁻¹ (Tabela 4.3), o que demonstra assim que o valor de DOT do primeiro estágio influenciou a produtividade em etanol do segundo estágio de arejamento. Deste modo, conclui-se que o controlo da DOT a 50% consistiu na melhor estratégia para o primeiro estágio de arejamento, pois para além de ter permitido obter a maior μ_{max} e o maior $Y_{\text{biomassa/substrato}}$ no primeiro estágio, também permitiu obter a maior r_{etanol} no segundo estágio de arejamento.

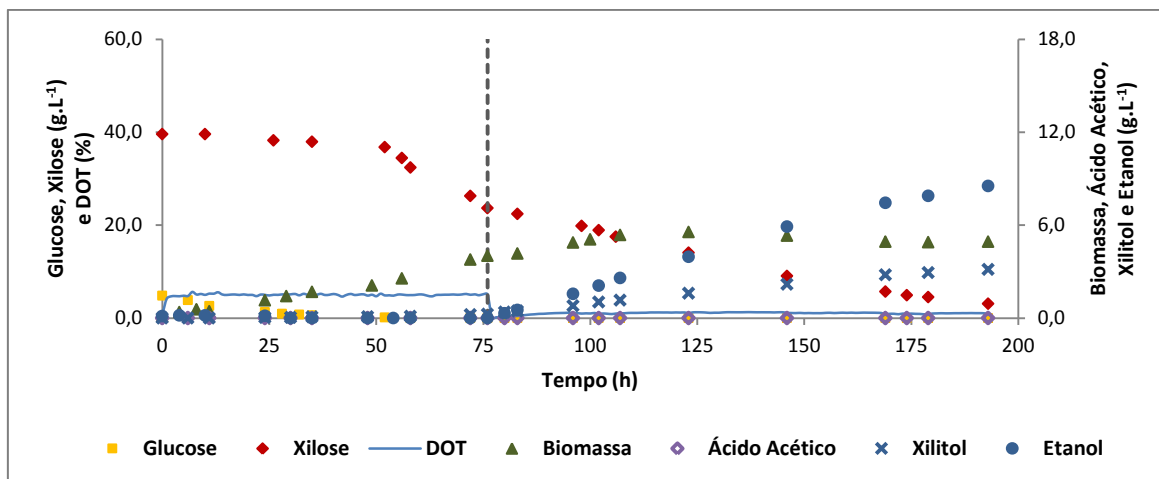


Figura 4.9 – Ensaio em meio sintético com DOT 5% - 0 mL_{A_r}.min⁻¹ e 250 rpm. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.

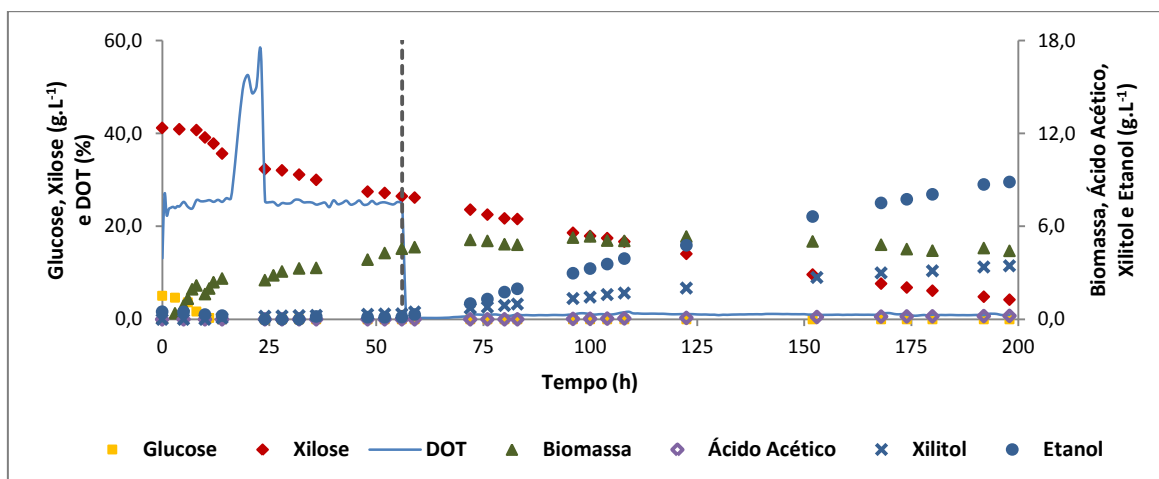


Figura 4.10 – Ensaio em meio sintético com DOT 25% - 0 mL_{A_r}.min⁻¹ e 250 rpm. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.

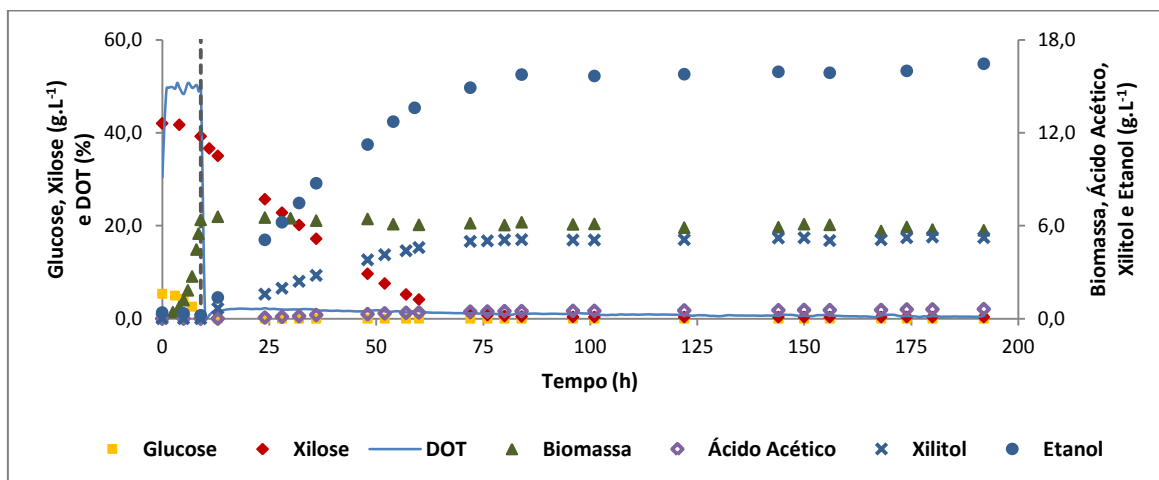


Figura 4.11 – Ensaio em meio sintético com DOT 50% - 0 mL_{A_r}.min⁻¹ e 250 rpm. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.

4. Resultados e Discussão

Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos de cada estágio dos ensaios em meio sintético com dois estágios de arejamento, em que se aumentou a disponibilidade de oxigénio do primeiro estágio e se manteve a mesma disponibilidade de oxigénio do segundo estágio.

	DOT 5% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm		DOT 25% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm		DOT 50% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm	
	1º Estágio	2º Estágio	1º Estágio	2º Estágio	1º Estágio	2º Estágio
μ_{max} (h ⁻¹)	0,33	-	0,43	-	0,43	-
[Biomassa] _{max} (g.L ⁻¹)	4,03	5,56	4,56	5,36	6,38	6,58
[Etanol] _{max} (g.L ⁻¹)	-	8,53	-	8,87	-	15,8
[Xilitol] _{max} (g.L ⁻¹)	-	3,14	-	3,45	-	5,10
$r_{glucose}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,09	-	0,41	-	0,58	-
r_{xilose} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,21	0,18	0,26	0,16	0,31	0,52
Açúcares Consumidos (%)	46,7	46,3	42,7	48,1	16,9	82,2
r_{etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	-	0,07	-	0,06	-	0,21
$r_{xilitol}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	-	0,02	-	0,02	-	0,07
$Y_{biomassa/substrato}$ (g.g ⁻¹)	0,19	-	0,22	-	0,78	-
$Y_{etanol/substrato}$ (g.g ⁻¹)	-	0,41	-	0,39	-	0,40
$Y_{xilitol/xilose}$ (g.g ⁻¹)	-	0,14	-	0,14	-	0,13

Nos ensaios DOT 5% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.9), DOT 25% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.10), e DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.11), para além da produção de etanol, também se verificou a produção de xilitol durante o segundo estágio de arejamento. A acumulação de xilitol resulta do desequilíbrio no rácio entre o NADH e o NAD⁺. A xilose redutase (XR) da *S. stipitis* é capaz de utilizar tanto o NADPH como o NADH (Figura 2.4), assim caso a XR utilizasse sempre o NADH, ocorreria um balanço equilibrado com o NAD⁺ que serve de cofator à xilose desidrogenase

(XDH), e não se acumulava xilitol (99, 106). No entanto, a XR da *S. stipitis* tem maior afinidade para o NADPH (107) e, para além disso, também não tem sido detetada atividade de transdesidrogenase em *S. stipitis*, a qual permitiria a conversão do NADH em NAD^+ (106). Assim, a *S. stipitis* necessita de oxigénio para equilibrar o rácio entre o NADH e o NAD^+ , pois o oxigénio, ao servir de acetor final de eletrões na cadeia respiratória, permite a regeneração do NAD^+ a partir do NADH (99, 106). Deste modo, a acumulação de xilitol nestes ensaios pode ser atribuída à restrição de oxigénio imposta durante o segundo estágio de arejamento. Desta forma, no segundo estágio de arejamento dos ensaios DOT 5% - 0 $\text{mL}_{\text{Ar}}\cdot\text{min}^{-1}$ e 250 rpm, DOT 25% - 0 $\text{mL}_{\text{Ar}}\cdot\text{min}^{-1}$ e 250 rpm, e DOT 50% - 0 $\text{mL}_{\text{Ar}}\cdot\text{min}^{-1}$ e 250 rpm, a taxa volumétrica de produção de xilitol, r_{xilitol} , foi de 0,02, 0,02 e 0,07 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, e o rendimento em xilitol, $Y_{\text{xilitol/xilose}}$, foi de 0,14, 0,14, 0,13 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respetivamente (Tabela 4.3). Estes resultados demonstram que, tal como para o etanol, a utilização de um maior valor de DOT no primeiro estágio aumentou a produtividade em xilitol do segundo estágio de arejamento, sem que o seu rendimento fosse afetado.

4.2.2.2 Impacto do aumento da disponibilidade de oxigénio do segundo estágio de arejamento

Nos ensaios DOT 50% - 0 $\text{mL}_{\text{Ar}}\cdot\text{min}^{-1}$ e 250 rpm (Figura 4.11), DOT 50% - 50 $\text{mL}_{\text{Ar}}\cdot\text{min}^{-1}$ e 150 rpm (Figura 4.12), e DOT 50% - DOT 1% (Figura 4.13), o primeiro estágio foi realizado nos três ensaios com controlo da DOT a 50%, tendo-se variado apenas a disponibilidade de oxigénio do segundo estágio de arejamento. O primeiro estágio destes ensaios foi realizado com controlo da DOT a 50%, pois, como foi referido na secção anterior, este valor de DOT permitiu que a densidade ótica de 14, à qual se procedeu à mudança de estágio, fosse atingida num curto período de tempo e com reduzido dispêndio de açúcares. Além disso, o controlo da DOT a 50% no primeiro estágio também favoreceu a produtividade em etanol do segundo estágio de arejamento. Como era de esperar, a *S. stipitis* C4 apresentou um desempenho similar no primeiro estágio de arejamento dos três ensaios (Tabela 4.4). Deste modo, nestes ensaios foi assim possível comparar três diferentes estratégias de arejamento do segundo estágio: uma sem fornecimento de ar (0 $\text{mL}_{\text{Ar}}\cdot\text{min}^{-1}$ e 250 rpm); outra com fornecimento de ar a um caudal fixo (50 $\text{mL}_{\text{Ar}}\cdot\text{min}^{-1}$ e 250 rpm); e outra, também com fornecimento de ar, mas utilizando um caudal de ar e uma velocidade de agitação variáveis de modo a controlar a DOT no valor de 1%.

A mudança de estágio de arejamento nos ensaios DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.11), DOT 50% - 50 mL_{Ar}.min⁻¹ e 150 rpm (Figura 4.12), e DOT 50% - DOT 1% (Figura 4.13), permitiu, tal como já tinha sido referido para o primeiro, induzir a produção de etanol. Deste modo, a concentração máxima de etanol do segundo estágio de arejamento dos três ensaios foi de 15,8, 11,4 e 1,67 g.L⁻¹, e a r_{etanol} do segundo estágio de arejamento dos três ensaios foi de 0,21, 0,21 e 0,09 g.L⁻¹.h⁻¹, respetivamente (Tabela 4.4). Por sua vez, o $Y_{etanol/substrato}$ do segundo estágio de arejamento dos três ensaios foi respetivamente de 0,40, 0,29 e 0,06 g.g⁻¹ (Tabela 4.4). Estes resultados mostram que a estratégia de arejamento do segundo estágio do ensaio DOT 50% - DOT 1% não permitiu uma produção viável de etanol, pelo que a discussão se focará nas estratégias de arejamento do segundo estágio dos outros dois ensaios. Os segundos estágios de arejamento dos ensaios DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm e DOT 50% - 50 mL_{Ar}.min⁻¹ e 150 rpm apresentaram a mesma r_{etanol} (Tabela 4.4). No entanto, o segundo estágio de arejamento do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm permitiu obter tanto uma maior concentração máxima de etanol, como um maior $Y_{etanol/substrato}$ (Tabela 4.4). O maior $Y_{etanol/substrato}$ do segundo estágio de arejamento do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm é explicado pelo facto de, ao contrário do ensaio DOT 50% - 50 mL_{Ar}.min⁻¹ e 150 rpm, não se ter verificado a reassimilação do etanol pela *S. stipitis* C4, como se comprova pelo patamar de etanol que foi obtido após o esgotamento da xilose no ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.11). No ensaio DOT 50% - 50 mL_{Ar}.min⁻¹ e 150 rpm a reassimilação do etanol resultou do facto de o segundo estágio de arejamento ter decorrido com uma maior disponibilidade de oxigénio, pois no segundo estágio deste ensaio foi fornecido um caudal de ar de 50 mL.min⁻¹, ao contrário do segundo estágio de arejamento do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm que decorreu sem fornecimento de ar. Com efeito, Skoog *et al.* (1992) verificaram em *S. stipitis* que a passagem de condições microaerófilas (100 mL_{Ar}.min⁻¹ e 550 rpm) para condições aeróbias (1000 mL_{Ar}.min⁻¹ e 1000 rpm), num reator contínuo com mistura perfeita alimentado com xilose e etanol, permitia aumentar a taxa específica de consumo de etanol de 0,13 para 0,17 g.g⁻¹.h⁻¹, respetivamente (141). Deste modo, a melhor estratégia de arejamento para o segundo estágio consistiu assim em se operar sem fornecimento de ar, ou seja, com 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, pois deste modo eliminou-se a reassimilação de etanol e maximizou-se o seu rendimento.

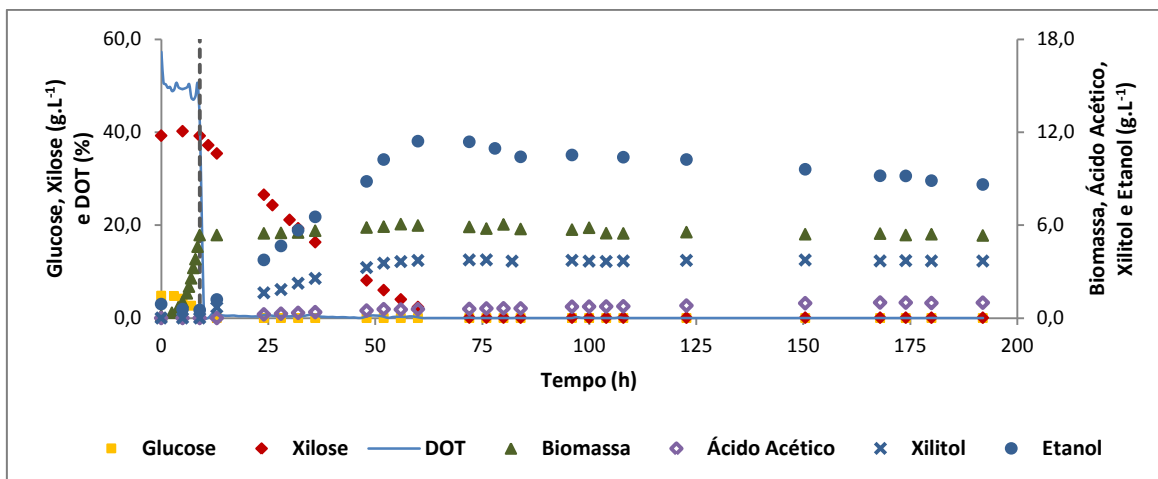


Figura 4.12 – Ensaio em meio sintético com DOT 50% - 50 mL_{Ar}.min⁻¹ e 150 rpm. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.

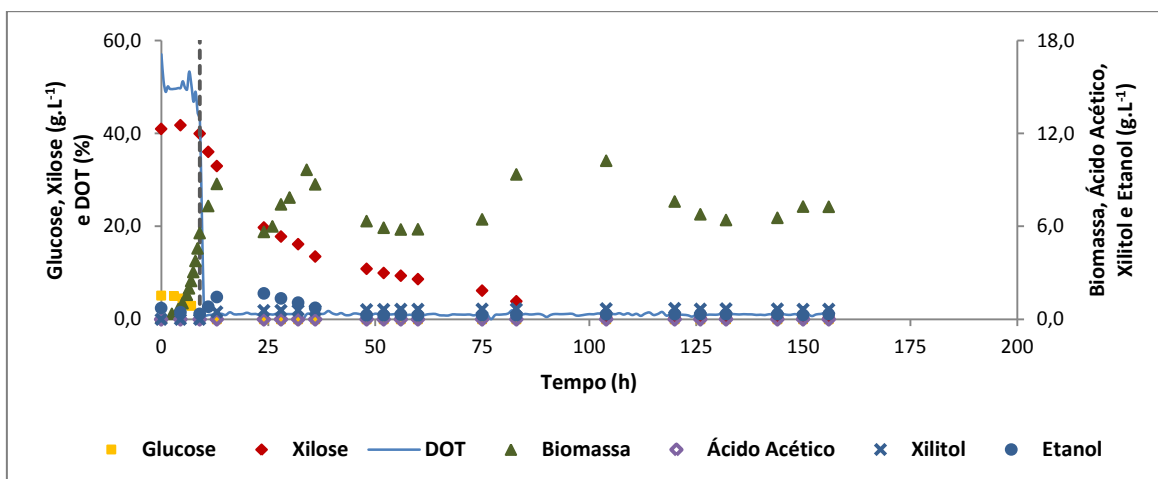


Figura 4.13 – Ensaio em meio sintético com DOT 50% - DOT 1%. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.

No ensaio DOT 50% - 50 mL_{Ar}.min⁻¹ e 150 rpm a transferência de oxigênio para o meio fermentativo durante o segundo estágio de arejamento foi realizada com um K_{La} de 0,6 h⁻¹, o qual é inferior aos valores de K_{La} referidos na literatura como ótimos para a produção de etanol por *S. stipitis*, 2,3 – 4,9 h⁻¹ (11, 133). No entanto, os valores da literatura foram obtidos em fermentações com um único estágio de arejamento, nas quais foi necessário um compromisso entre a produção de etanol e a produção de biomassa, de modo a garantir o equilíbrio entre o rendimento e a produtividade em etanol (11). Assim, como as fermentações com dois estágios de arejamento permitem que exista uma elevada densidade celular no segundo estágio, o valor de K_{La} desse estágio pode ser inferior aos das fermentações com apenas um único estágio de arejamento, pois o objetivo do segundo

estágio de arejamento consiste na maximização do rendimento em etanol, através da redução tanto do crescimento como da reassimilação de etanol. Neste trabalho, a importância de se utilizar um K_{La} reduzido no segundo estágio de arejamento é demonstrada inclusivamente pelo facto dos melhores resultados de produção de etanol terem sido obtidos no ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, no qual o segundo estágio de arejamento decorreu sem fornecimento de ar, havendo apenas o contacto do meio fermentativo com a fase gasosa da parte superior do biorreator.

Tabela 4.4 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos de cada estágio dos ensaios em meio sintético com dois estágios de arejamento, em que se manteve a mesma disponibilidade de oxigénio do primeiro estágio e se aumentou a disponibilidade de oxigénio do segundo estágio.

	DOT 50% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm		DOT 50% - 50 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 150 rpm		DOT 50% - DOT 1%	
	1º Estágio	2º Estágio	1º Estágio	2º Estágio	1º Estágio	2º Estágio
μ_{max} (h ⁻¹)	0,43	-	0,44	-	0,43	-
[Biomassa] _{max} (g.L ⁻¹)	6,38	6,58	5,36	6,06	5,57	10,2
[Etanol] _{max} (g.L ⁻¹)	-	15,8	-	11,4	-	1,67
[Xilitol] _{max} (g.L ⁻¹)	-	5,10	-	3,72	-	0,57
$r_{glucose}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,58	-	0,51	-	0,53	-
r_{xilose} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,31	0,52	-	0,72	-	0,42
Açúcares Consumidos (%)	16,9	82,2	10,4	84,2	12,6	86,4
r_{etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	-	0,21	-	0,21	-	0,09
$r_{xilitol}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	-	0,07	-	0,07	-	0,04
$Y_{biomassa/substrato}$ (g.g ⁻¹)	0,78	-	1,13	-	0,93	-
$Y_{etanol/substrato}$ (g.g ⁻¹)	-	0,40	-	0,29	-	0,06
$Y_{xilitol/xilose}$ (g.g ⁻¹)	-	0,13	-	0,10	-	0,03

O ensaio DOT 50% - DOT 1% (Figura 4.13) apesar de não ter permitido uma produção viável de etanol, apresentou contudo uma situação curiosa, pois ao contrário do ensaio com um único estágio de arejamento com controlo da DOT a 1% (Figura 4.4), neste foi possível produzir etanol com controlo da DOT a 1% durante o segundo estágio de arejamento. No entanto, o etanol produzido foi rapidamente reabsorvido pela *S. stipitis* C4 devido à elevada disponibilidade de oxigénio. Neste caso, a produção de etanol foi induzida, não pela limitação de oxigénio, mas sim pela diminuição da DOT. Com efeito, Passoth *et al.* (1996) verificaram que após a redução da DOT de 80 para 20% ocorria um aumento da atividade da PDC da *S. stipitis* durante as primeiras 4 h seguintes. No entanto, estes autores verificaram que ao fim desse período de tempo a atividade da PDC diminuía até à sua inativação (128). Esta redução da atividade da PDC no estudo desenvolvido por Passoth *et al.* (1996) é consistente com a produção de etanol do ensaio DOT 50% - DOT 1%, pois também só se verificou a produção de etanol nas primeiras horas após a redução da DOT. Num outro estudo, Klinner *et al.* (2005) mostraram que a redução contínua da DOT induzia a produção de etanol em *S. stipitis*. Estes autores colocaram assim a hipótese de que em resultado da diminuição da disponibilidade de oxigénio a *S. stipitis* reduz o seu consumo, de modo a prevenir uma limitação real (152).

Nos ensaios DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.11) e DOT 50% - 50 mL_{Ar}.min⁻¹ e 150 rpm (Figura 4.12) verificou-se, como já foi referido para o primeiro, a acumulação de xilitol durante o segundo estágio de arejamento. Assim, nestes dois ensaios a concentração máxima de xilitol foi de respetivamente 5,10 e 3,72 g.L⁻¹, o $Y_{xilitol/xilose}$ no segundo estágio de arejamento foi de respetivamente 0,13 e 0,10 g.g⁻¹, e a $r_{xilitol}$ no segundo estágio de arejamento foi de 0,07 g.L⁻¹.h⁻¹ para ambos os ensaios (Tabela 4.4). Por sua vez, no ensaio DOT 50% - DOT 1% (Figura 4.13) praticamente não se verificou a acumulação de xilitol durante o segundo estágio de arejamento, o que resultou, provavelmente, da elevada disponibilidade de oxigénio com que decorreu o segundo estágio deste ensaio, pois a elevada disponibilidade de oxigénio permitiu equilibrar o rácio entre o NADH e o NAD⁺. O menor $Y_{xilitol/xilose}$ do segundo estágio de arejamento do ensaio DOT 50% - 50 mL_{Ar}.min⁻¹ e 150 rpm relativamente ao ensaio DOT 0% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm também pode ser atribuído ao papel do oxigénio no equilíbrio do rácio entre o NADH e o NAD⁺, pois, ao contrário do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, no ensaio DOT 50% - 50 mL_{Ar}.min⁻¹ e 150 rpm foi fornecido durante o segundo estágio de arejamento um caudal de

ar de 50 mL.min⁻¹. Com efeito, Bellido *et al.* (2013) verificaram que o aumento do K_{La} permitia reduzir a acumulação de xilitol (133).

4.2.2.3 Melhor ensaio com dois estágios de arejamento considerando toda a fermentação

Na Tabela 4.5 são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos dos ensaios em meio sintético com dois estágios de arejamento considerando toda a fermentação. Como era de esperar, os melhores resultados foram obtidos no ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, no qual se obteve uma concentração máxima de etanol de 15,8 g.L⁻¹, uma r_{etanol} de 0,18 g.L⁻¹.h⁻¹ e um $Y_{etanol/substrato}$ de 0,33 g.g⁻¹, o que correspondeu a uma eficiência de conversão de 64,1%. Neste ensaio obteve-se um maior $Y_{etanol/substrato}$ que no ensaio em Erlenmeyer com meio sintético (Tabela 4.1), contudo a r_{etanol} foi inferior. A menor r_{etanol} do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm relativamente ao ensaio em Erlenmeyer com meio sintético resultou da restrita disponibilidade de oxigénio imposta durante o segundo estágio de arejamento, pois, como a assimilação dos açúcares depende em parte do transporte ativo, a restrição de oxigénio reduz a energia disponível para o transporte dos açúcares, obtendo-se assim uma menor taxa de consumo de açúcares e consequentemente uma menor produtividade em etanol (99, 136).

Tabela 4.5 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos dos ensaios em meio sintético com dois estágios de arejamento considerando toda a fermentação.

	DOT 5% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm	DOT 25% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm	DOT 50% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm	DOT 50% - 50 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 150 rpm	DOT 50% - DOT 1%
[Etanol] _{max} (g.L ⁻¹)	8,53	8,87	15,8	11,4	1,67
r_{etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,04	0,04	0,18	0,18	0,04
$Y_{etanol/substrato}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,20	0,20	0,33	0,25	0,04
Eficiência de Conversão (%)	39,8	39,0	64,1	49,4	7,1

Furlan *et al.* (1994) também testaram a aplicação de uma estratégia com dois estágios de arejamento na produção de etanol por *S. stipitis* a partir de 50 g.L⁻¹ de xilose (132). Estes autores no primeiro estágio de arejamento utilizaram um K_{La} de 4,8 h⁻¹ (128

mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm) e no segundo estágio de arejamento utilizaram 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, sendo que procederam à mudança de estágio ao fim de 60 h de fermentação. Assim, através desta estratégia de arejamento Furlan *et al.* (1994) obtiveram um $Y_{\text{etanol/substrato}}$ de 0,38 g.g⁻¹ e uma r_{etanol} de 0,09 g.L⁻¹.h⁻¹. Estes autores obtiveram um $Y_{\text{etanol/substrato}}$ ligeiramente superior ao do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Tabela 4.5), contudo a r_{etanol} obtida por estes autores foi metade da obtida no ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Tabela 4.5), o que demonstrou que o controlo da DOT a 50% durante o primeiro estágio de arejamento permite uma melhoria considerável da produtividade em etanol numa estratégia com dois estágios de arejamento.

Tabela 4.6 – Comparação dos resultados do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm com os resultados obtidos na literatura para fermentações com um único estágio de arejamento.

Referência	Substrato	Caudal de ar (vvm)	Agitação (rpm)	K_La (h ⁻¹)	OTR (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{\text{etanol/substrato}}$ (g.g ⁻¹)	r_{etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Este trabalho	Xilose (40 g.L ⁻¹) Glucose (5 g.L ⁻¹)	NA	NA	NA	NA	0,33	0,18
(132)	Xilose (50 g.L ⁻¹)	0,08	250	4,8	ND	0,35	0,14
(131)	Xilose (50 g.L ⁻¹)	0,005	800	ND	1,75	0,43	ND
(130)	Xilose (50 g.L ⁻¹)	0,1	160	2,3	0,58	0,40	ND
(11)	Xilose (90 g.L ⁻¹) Glucose (15 g.L ⁻¹) Arabinose (15 g.L ⁻¹)	ND	ND	4,9	ND	0,32	0,32
(133)	Glucose (35 g.L ⁻¹) Xilose (20 g.L ⁻¹)	0,10	175	3,3	ND	0,40	0,30

ND – Dados não disponíveis. NA – Não aplicável.

A Tabela 4.6 sumaria os resultados obtidos por vários autores na produção de etanol por *S. stipitis* utilizando uma estratégia de fermentação com único estágio de arejamento. Constata-se que o $Y_{\text{etanol/substrato}}$ do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm deste trabalho foi em geral próximo do $Y_{\text{etanol/substrato}}$ obtido por estes autores, apesar de ter sido ligeiramente inferior relativamente a alguns estudos. Por sua vez, a r_{etanol} do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm deste trabalho foi ligeiramente superior à obtida por Furlan *et al.* (1994) (132), contudo foi consideravelmente menor que a obtida por Silva *et al.* (2012) (11) e Bellido *et al.* (2013) (133). Estes resultados mostram que a aplicação da estratégia com dois estágios de arejamento do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm não permitiu obter em meio sintético melhores resultados que a estratégia com um único estágio de arejamento utilizada pela maioria destes autores. Todavia, a estratégia com dois

estágios de arejamento, como a do ensaio DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, apresenta maior potencial na perspetiva da aplicação ao HSSL, pois o primeiro estágio de arejamento com controlo da DOT permitiu o estímulo do crescimento da *S. stipitis*, o que em HSSL se torna fundamental devido à sua elevada concentração de inibidores.

4.2.3 Ensaio com dois estágios de arejamento utilizando HSSL

A estratégia com dois estágios de arejamento, DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm, foi aplicada na fermentação de 60% HSSL/40% meio sintético (v/v), de modo a avaliar o potencial desta estratégia de arejamento na fermentação deste substrato.

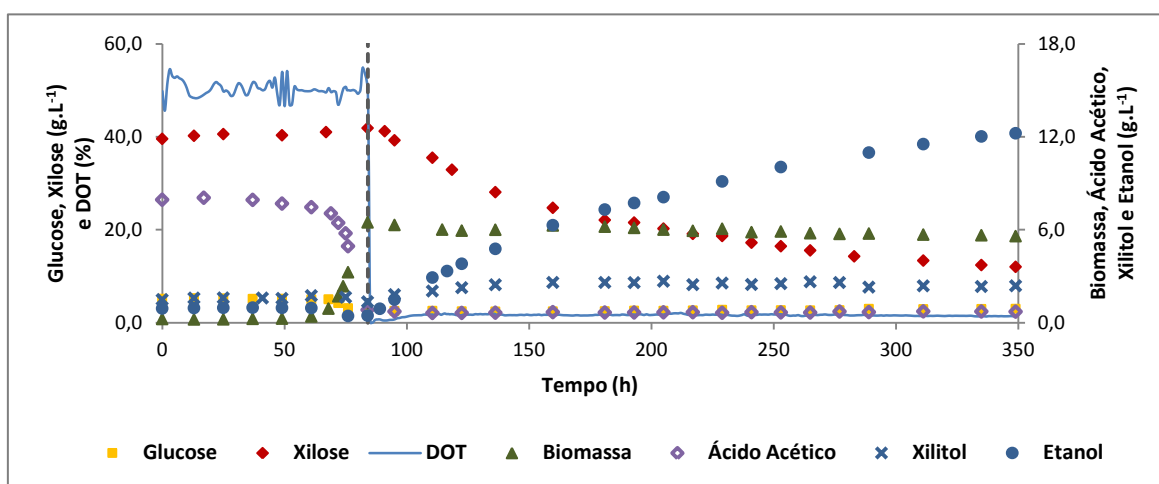


Figura 4.14 – Ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm. A linha a tracejado indica a mudança de estágio de arejamento.

Na Figura 4.14 é apresentado o perfil fermentativo do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm. Neste ensaio, observou-se o arranque do crescimento da *S. stipitis* C4 ao fim de 61 h de incubação, o que demonstra que a estratégia com dois estágios de arejamento, ao promover o crescimento durante o primeiro estágio, tem elevado potencial para a aplicação ao HSSL, pois, como foi descrito na secção 4.1, no ensaio em Erlenmeyer com 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) (Figura 4.3) não se observou qualquer crescimento da *S. stipitis* C4 durante as 130 h de incubação. Este resultado mostra que a elevada disponibilidade de oxigénio durante o primeiro estágio de arejamento aumentou a tolerância da *S. stipitis* C4 aos inibidores do HSSL. Com efeito, van Zyl *et al.* (1991) verificaram que, num meio contendo 50 g.L⁻¹ de xilose e 10 g.L⁻¹ de ácido acético, a passagem de condições de limitação de oxigénio (Erlenmeyer de 500 mL com 250 mL de volume útil a 130 rpm) para condições aeróbias (Erlenmeyer de 1 L com

150 mL de volume útil a 180 rpm) permitia um aumento da μ_{max} da *S. stipitis* em 2,5 vezes (113). O aumento da tolerância da *S. stipitis* aos inibidores com a utilização de uma elevada disponibilidade de oxigénio resulta, provavelmente, da maior disponibilidade de energia que existe na célula para fazer face ao stress provocado pelos inibidores.

Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos de cada estágio de arejamento do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm.

	Ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v): DOT 50% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm	
	1º Estágio	2º Estágio
μ_{max} (h ⁻¹)	0,17	-
[Biomassa] _{max} (g.L ⁻¹)	6,47	-
[Etanol] _{max} (g.L ⁻¹)	-	12,2
[Xilitol] _{max} (g.L ⁻¹)	-	2,66
$r_{glucose}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,03	-
r_{xilose} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	-	0,11
$r_{ácido\ acético}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,08	-
Açúcares Consumidos (%)	5,7	66,8
r_{etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	-	0,04
$r_{xilitol}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	-	0,004
$Y_{biomassa/substrato}$ (g.g ⁻¹)	0,65	-
$Y_{etanol/substrato}$ (g.g ⁻¹)	-	0,39
$Y_{xilitol/xilose}$ (g.g ⁻¹)	-	0,03

Os resultados do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.14) serão discutidos tendo por base a comparação com o ensaio em meio sintético com DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm (Figura 4.11). No ensaio em meio sintético, praticamente não se observou a ocorrência de fase lag. No entanto, no ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) observou-se uma fase lag de cerca de 61 h, a qual se deve, provavelmente, ao elevado conteúdo em inibidores do HSSL (56, 77, 146). Após a fase lag, obteve-se no ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) uma μ_{max} de 0,17 h⁻¹ (Tabela 4.7), a qual foi inferior à do ensaio em meio sintético. A menor μ_{max} do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) relativamente ao ensaio em meio sintético também pode ser atribuída ao elevado conteúdo em inibidores do HSSL (56, 77, 146). Com efeito, Xavier *et al.* (2010) verificaram que a μ_{max} da *S. stipitis* diminuía

com o aumento da percentagem de HSSL (56). No ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) a glucose foi, tal como no ensaio em meio sintético, consumida primeiro que a xilose. No entanto, no ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) a par com a glucose foi também assimilado ácido acético, o qual foi completamente consumido durante o primeiro estágio de arejamento. Com efeito, Pereira *et al.* (2015) também observaram o consumo de ácido acético pela *S. stipitis* C4 em 60% HSSL (v/v) (121). A utilização do ácido acético como fonte de carbono pela *S. stipitis* C4 permitiu que apenas 5,7% dos açúcares tenham sido consumidos durante o primeiro estágio de arejamento (Tabela 4.7), o que corresponde a uma percentagem 3,0 vezes menor que a do primeiro estágio de arejamento do ensaio em meio sintético (Tabela 4.4). Deste modo, a utilização do ácido acético como fonte de carbono para o crescimento da *S. stipitis* C4 permitiu assim que uma maior percentagem de açúcares estivesse disponível para a produção de etanol durante o segundo estágio de arejamento do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v). No ensaio em meio sintético a mudança de estágio de arejamento ocorreu quando se atingiu uma densidade ótica a 620 nm de cerca de 14, enquanto que no ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) a mudança de estágio ocorreu quando se atingiu uma densidade ótica a 620 nm de cerca de 20. Contudo, a biomassa no final do primeiro estágio de arejamento dos dois ensaios foi similar, no final do primeiro estágio de arejamento do ensaio em meio sintético existiam $6,38 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa (Tabela 4.4) e no final do primeiro estágio de arejamento do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) existiam $6,47 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa (Tabela 4.7). Tal como no ensaio em meio sintético, a mudança do primeiro estágio de arejamento, com controlo da DOT a 50%, para o segundo estágio de arejamento, com $0 \text{ mL}_{\text{Ar}}.\text{min}^{-1}$ e 250 rpm, permitiu induzir a produção de etanol e reprimir o crescimento da *S. stipitis* C4. No entanto, ao contrário do ensaio em meio sintético, no ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) o fim da produção de etanol ocorreu quando ainda restavam $12,0 \text{ g.L}^{-1}$ de xilose no meio. Porém, atendendo à composição química do HSSL é provável que o valor de $12,0 \text{ g.L}^{-1}$ corresponda na verdade à concentração de outros açúcares (56, 77, 146), os quais em HPLC podem ter sido analisados simultaneamente com a xilose. De facto, atendendo à descrição da composição química do HSSL apresentada por Xavier *et al.* (2010), para além da glucose e xilose o HSSL contém também quantidades assinaláveis de arabinose e manose ($7,8 \text{ g.L}^{-1}$) (56). A arabinose apesar de poder ser utilizada pela *S. stipitis* para o crescimento não é utilizada

para a produção de etanol (100, 101), o que justifica assim que no ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) a produção de etanol tenha terminado quando ainda existam açúcares no meio. Todavia, no segundo estágio de arejamento do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) obteve-se ainda assim uma concentração máxima de etanol de $12,2 \text{ g.L}^{-1}$ (Tabela 4.7). Para além disso, o $Y_{\text{etanol/substrato}}$ e a r_{etanol} do segundo estágio de arejamento do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) foi respetivamente de 0,39 g.g^{-1} e 0,04 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Tabela 4.7). O $Y_{\text{etanol/substrato}}$ do segundo estágio de arejamento do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) foi similar ao do segundo estágio de arejamento do ensaio em meio sintético (0,40 g.g^{-1}), contudo, a r_{etanol} foi consideravelmente inferior à do segundo estágio de arejamento do ensaio em meio sintético (0,21 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Estes resultados mostram que durante o segundo estágio de arejamento apesar de não ter existido ácido acético existiam, provavelmente, outros inibidores, nomeadamente lenhosulfonatos e compostos fenólicos de baixo peso molecular, que foram responsáveis pela menor r_{etanol} durante o segundo estágio de arejamento do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v).

No ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 $\text{mL}_{\text{Ar}}.\text{min}^{-1}$ e 250 rpm a concentração máxima de xilitol foi de $2,66 \text{ g.L}^{-1}$ e o $Y_{\text{xilitol/xilose}}$ do segundo estágio de arejamento foi de 0,03 g.g^{-1} (Tabela 4.7). Deste modo, obteve-se uma redução no $Y_{\text{xilitol/xilose}}$ do segundo estágio de 4,3 vezes entre o ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) (Tabela 4.7) e o ensaio em meio sintético com DOT 50% - 0 $\text{mL}_{\text{Ar}}.\text{min}^{-1}$ e 250 rpm (Tabela 4.4). Mahler *et al.* (2000) mostraram que a redução da concentração de magnésio de 4 mM para 1 mM induzia a produção de xilitol por *S. stipitis* (153), pelo que, para além da restrição de oxigénio, a acumulação de xilitol também pode ser determinada limitação de magnésio (153, 154). Estes autores mostraram que a limitação de magnésio inibe a álcool desidrogenase (ADH), o que leva ao aumento do NADH intracelular (Figura 2.4), estimulando assim a acumulação de xilitol (154). Deste modo, a menor acumulação de xilitol do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) relativamente ao ensaio em meio sintético resultou, provavelmente, de uma maior concentração de magnésio no ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v), pois o HSSL utilizado neste trabalho resultou de um cozimento cuja base utilizada foi o magnésio. Com efeito, Fernandes *et al.* (2012) obtiveram uma concentração de Mg^{2+} de cerca de 6 g.L^{-1} para um HSSL resultante de um cozimento cuja base utilizada também foi o magnésio (77).

Na Tabela 4.8 são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm considerando toda a fermentação. Neste ensaio obteve-se assim uma concentração máxima de etanol de 12,2 g.L⁻¹, uma r_{etanol} de 0,03 g.L⁻¹.h⁻¹ e um $Y_{etanol/substrato}$ de 0,38 g.g⁻¹, o que correspondeu a uma eficiência de conversão de 74,4%. Xavier *et al.* (2010) verificaram que em Erlenmeyer o crescimento da *S. stipitis* NRRL Y-7124 era completamente inibido em 60% HSSL (v/v) (56). Por sua vez, Pereira *et al.* (2015), utilizando tal como neste trabalho a *S. stipitis* C4, obtiveram na fermentação de 60% HSSL em biorreator com 240 mL_{Ar}.min⁻¹ e 240 rpm uma μ_{max} de 0,07 h⁻¹, uma r_{etanol} de 0,05 g.L⁻¹.h⁻¹ e um $Y_{etanol/substrato}$ de 0,16 g.g⁻¹ (121). A μ_{max} obtida por estes autores foi 2,4 vezes menor que a obtida neste trabalho, o que demonstra que a estratégia com dois estágios de arejamento com controlo da DOT a 50% durante o primeiro estágio estimulou de forma eficiente o crescimento da *S. stipitis* C4 em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v). Porém, estes autores obtiveram uma r_{etanol} superior à obtida neste trabalho, o que se pode dever à severa restrição de oxigénio imposta neste trabalho durante o segundo estágio de arejamento. Contudo, a maior produtividade em etanol também pode estar associada a um menor conteúdo em inibidores do HSSL utilizado Pereira *et al.* (2015) relativamente ao utilizado neste trabalho. Todavia, o $Y_{etanol/substrato}$ obtido por Pereira *et al.* (2015) foi 2,4 vezes menor que o obtido neste trabalho, o que resultou, provavelmente, do crescimento excessivo e da reassimilação de etanol no trabalho desenvolvido por Pereira *et al.* (2015). Assim, a menor eficiência da *S. stipitis* C4 na conversão dos açúcares a etanol no trabalho desenvolvido por Pereira *et al.* (2015), demonstra o elevado potencial da estratégia com dois estágios de arejamento face à estratégia com um único estágio de arejamento na fermentação do HSSL.

Tabela 4.8 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos do ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm considerando toda a fermentação.

	Ensaio em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v): DOT 50% - 0 mL _{Ar} .min ⁻¹ e 250 rpm
[Etanol] _{max} (g.L ⁻¹)	12,2
r_{etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,03
$Y_{etanol/substrato}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,38
Eficiência de Conversão (%)	74,4

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que o conteúdo em inibidores do HSSL prejudica o crescimento da *S. stipitis* C4. Além disso, neste trabalho o controlo da DOT não permitiu a produção de etanol. No entanto, verificou-se que numa estratégia com dois estágios de arejamento, o controlo da DOT no primeiro estágio e a limitação de oxigénio no segundo, permitiu a eficiente conversão dos açúcares a etanol, tanto em meio sintético, como em 60% HSSL/40% meio sintético (v/v). No primeiro estágio de arejamento, a utilização de uma maior disponibilidade de oxigénio aumentou a μ_{max} e o $Y_{biomassa/substrato}$ da *S. stipitis* C4, o que permitiu uma redução tanto da duração, como da percentagem de açúcares consumidos neste estágio de arejamento. Além disso, o aumento da disponibilidade de oxigénio do primeiro estágio de arejamento permitiu também aumentar a r_{etanol} durante o segundo estágio de arejamento. Deste modo, numa estratégia com dois estágios de arejamento, o aumento da disponibilidade de oxigénio do primeiro estágio permite aumentar tanto a produtividade como o rendimento em etanol de toda a fermentação. No segundo estágio de arejamento, a limitação de oxigénio permitiu induzir com sucesso a produção de etanol. Para além disso, a restrita disponibilidade de oxigénio imposta durante o segundo estágio de arejamento permitiu, não só minimizar o crescimento da *S. stipitis* C4, como também eliminar a reassimilação de etanol, o que constitui uma importante vantagem da estratégia com dois estágios de arejamento face à estratégia com apenas um único estágio de arejamento. Assim, neste trabalho os melhores resultados de produção de etanol foram obtidos com o controlo da DOT a 50% no primeiro estágio de arejamento e com 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm no segundo estágio de arejamento. A aplicação desta estratégia de arejamento na fermentação de 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) mostrou-se crucial no crescimento da *S. stipitis* C4, pois a elevada disponibilidade de oxigénio durante o primeiro estágio de arejamento aumentou a sua tolerância aos inibidores. Neste trabalho, a fermentação de 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) com DOT 50% - 0 mL_{Ar}.min⁻¹ e 250 rpm permitiu obter uma r_{etanol} de 0,03 g.L⁻¹.h⁻¹ e um

5. Conclusão

$Y_{\text{etanol/substrato}}$ de $0,38 \text{ g.g}^{-1}$, o que correspondeu a uma eficiência de conversão de 74,4%. Este trabalho propõe assim a estratégia com dois estágios de arejamento como uma alternativa de arejamento promissora para a produção de bioetanol de segunda geração a partir de HSSL.

6. TRABALHO FUTURO

A estratégia com dois estágios de arejamento desenvolvida neste trabalho permitiu obter um elevado $Y_{\text{etanol/substrato}}$ a partir de 60% HSSL/40% meio sintético (v/v), contudo a r_{etanol} foi ainda reduzida. Um dos aspetos que prejudicou a r_{etanol} do ensaio com 60% HSSL/40% meio sintético (v/v) foi a longa fase lag, pelo que se deve investigar a possibilidade de reduzir a duração da fase lag, tanto pelo aumento da concentração inicial de biomassa, como pela pré-adaptação da levedura num inóculo contendo uma pequena percentagem de HSSL. No entanto, com vista a melhorar de forma efetiva a produtividade em etanol a partir de HSSL, a investigação futura deve ser conduzida de modo a integrar a produção de bioetanol em dois estágios de arejamento com a biodesintoxificação do HSSL pelo fungo filamentoso *Paecilomyces variotii*. Este fungo é capaz de reduzir o conteúdo em inibidores do HSSL sem consumir a xilose e, para além disso, a sua biomassa pode ser utilizada como proteína microbiana em rações animais. Deste modo, a integração da produção de proteína microbiana por *P. variotii* e da produção de bioetanol por *S. stipitis* C4 a partir do HSSL, num conceito de biorrefinaria, permitiria garantir a viabilidade da produção de bioetanol.

BIBLIOGRAFIA

1. Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos VE, Merchuk JC. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 2010. 49(3): p. 289-307.
2. Garcia-Ochoa F, Gomez E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 2009. 27(2): p. 153-176.
3. Escobar JC, Lora ES, Venturini OJ, Yáñez EE, Castillo EF, Almazan O. Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2009. 13(6-7): p. 1275-1287.
4. ICNF. IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental. Resultados preliminares. Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2013.
5. CEPI. Key Statistics 2014. Bruxelas: Confederation of European Paper Industries, 2015.
6. Pereira SR, Portugal-Nunes DJ, Evtuguin DV, Serafim LS, Xavier AMRB. Advances in ethanol production from hardwood spent sulphite liquors. *Process Biochemistry*, 2013. 48(2): p. 272-282.
7. Lawford HG, Rousseau JD. Production of ethanol from pulp mill hardwood and softwood spent sulfite liquors by genetically engineered *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1993. 39-40(1): p. 667-685.
8. Banerjee S, Mudliar S, Sen R, Giri B, Satpute D, Chakrabarti T, Pandey RA. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2010. 4(1): p. 77-93.
9. Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. The effect of aeration on D-xylose fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida shehatae*. *Biotechnology Letters*, 1986. 8(12): p. 897-900.
10. Limtong S, Sumpradit T, Kitpreechavanich V, Tuntirungkij M, Seki T, Yoshida T. Effect of acetic acid on growth and ethanol fermentation of xylose fermenting yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 2000. 34: p. 64-73.
11. Silva JPA, Mussatto SI, Roberto IC, Teixeira JA. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renewable Energy*, 2012. 37(1): p. 259-265.

12. Teixeira JA, Fonseca MM. Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações. Portugal: Lidel - Edições Técnicas, Lda, 2007.
13. Ratledge C, Kristiansen B. Basic Biotechnology: Cambridge University Press, 2006.
14. Unrean P, Nguyen NHA. Metabolic pathway analysis of *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. 94(5): p. 1387-1398.
15. Suresh S, Srivastava VC, Mishra IM. Techniques for oxygen transfer measurement in bioreactors: a review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2009. 84(8): p. 1091-1103.
16. Gros JB, Dussap CG, Catté M. Estimation of O₂ and CO₂ solubility in microbial culture media. Biotechnology Progress, 1999. 15(5): p. 923-927.
17. Díaz-Barrera A, Gutierrez J, Martínez F, Altamirano C. Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* grown at two bioreactor scales under oxygen-limited conditions. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014. 37(6): p. 1133-1140.
18. Özbek B, Gayik S. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. Process Biochemistry, 2001. 36(8-9): p. 729-741.
19. Lara AR, Knabben I, Regestein L, Sassi J, Caspeta L, Ramírez OT, Büchs J. Comparison of oxygen enriched air vs. pressure cultivations to increase oxygen transfer and to scale-up plasmid DNA production fermentations. Engineering in Life Sciences, 2011. 11(4): p. 382-386.
20. Lopes M, Mota M, Belo I. Oxygen mass transfer rate in a pressurized lab-scale stirred bioreactor. Chemical Engineering and Technology, 2013. 36(10): p. 1779-1784.
21. García-Ochoa F, Gómez E. Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. Biochemical Engineering Journal, 1998. 1(1): p. 1-10.
22. Martín M, Montes FJ, Galán MA. Bubbling process in stirred tank reactors II: Agitator effect on the mass transfer rates. Chemical Engineering Science, 2008. 63(12): p. 3223-3234.
23. Gaspar A, Strodiot L, Thonart P. Improvement of oxygen transfer coefficient during *Penicillium canescens* culture: Influence of turbine design, agitation speed, and air flow rate on xylanase production. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology, 1998. 70-72: p. 535-545.
24. Elibol M, Ozer D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. Process Biochemistry, 2000. 36(4): p. 325-329.
25. Abd-Aziz S, Fernandez CC, Salleh MM, Illias RM, Hassan MA. Effect of agitation and aeration rates on chitinase production using *Trichoderma virens* UKM1 in 2-l stirred tank reactor. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008. 150(2): p. 193-204.

26. Limpai boon K. Influence of operating conditions and physical properties of liquid medium on volumetric oxygen transfer coefficient in a dual impeller bioreactor. *Walailak Journal of Science and Technology*, 2013. 10(6): p. 625-634.
27. Puthli MS, Rathod VK, Pandit AB. Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 2005. 23(1): p. 25-30.
28. Amaral PFF, Freire MG, Rocha-Leão MHM, Marrucho IM, Coutinho JAP, Coelho MAZ. Optimization of oxygen mass transfer in a multiphase bioreactor with perfluorodecalin as a second liquid phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008. 99(3): p. 588-598.
29. Karimi A, Golbabaie F, Mehrnia MR, Neghab M, Mohammad K, Nikpey A, Pourmand MR. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2013. 10(1)
30. Converti A, Del Borghi M, Ferraiolo G, Sommariva C. Mechanical mixing and biological deactivation: the role of shear stress application time. *Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 1996. 62(3): p. 155-167.
31. Leung R, Poncelet D, Neufeld RJ. Enhancement of oxygen transfer rate using microencapsulated silicone oils as oxygen carriers. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1997. 68(1): p. 37-46.
32. Dobre T, Ohreac BS, Parvulescu OC, Danciu TD. Effect of solid carriers on oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor. *Revista de Chimie*, 2014. 65(4): p. 489-496.
33. Manikandan S, Karthikeyan N, Suganthi KS, Rajan KS. Enhancement of volumetric mass transfer coefficient for oxygen transfer using Fe_2O_3 -water nanofluids. *Asian Journal of Scientific Research*, 2012. 5(4): p. 271-277.
34. Bi Y, Hill GA, Sumner RJ. Enhancement of the overall volumetric oxygen transfer coefficient in a stirred tank bioreactor using ethanol. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 2001. 79(3): p. 463-467.
35. Arwa A, Baup S, Gondrexon N, Magnin JP, Willison J. Enhancement of mass transfer characteristics and phenanthrene degradation in a two-phase partitioning bioreactor equipped with internal static mixers. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011. 16(2): p. 413-418.
36. García-Ochoa F, Castro EG, Santos VE. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000. 27(9): p. 680-690.
37. IEA. Key world energy statistics. Paris: OECD/IEA, 2015.
38. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 2011. 52(2): p. 858-875.

39. UE. Directive on the promotion of the use of energy from renewable sources. Official Journal of the European Union, 2009a.
40. RFA. 2015 Ethanol industry outlook. Washington, DC: Renewable Fuels Association, 2015.
41. Nigam PS, Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2011. 37(1): p. 52-68.
42. Białas W, Szymanowska D, Grajek W. Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling. *Bioresource Technology*, 2010. 101(9): p. 3126-3131.
43. Montesinos T, Navarro JM. Role of the maltose in the simultaneous-saccharification-fermentation process from raw wheat starch and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Engineering*, 2000. 23(4): p. 319-322.
44. Gibreel A, Sandercock JR, Lan J, Goonewardene LA, Zijlstra RT, Curtis JM, Bressler DC. Fermentation of barley by using *Saccharomyces cerevisiae*: Examination of barley as a feedstock for bioethanol production and value-added products. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009. 75(5): p. 1363-1372.
45. Dziugan P, Balcerek M, Pielech-Przybylska K, Patelski P. Evaluation of the fermentation of high gravity thick sugar beet juice worts for efficient bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 2013. 6(1)
46. Gupta N, Dubey A, Tewari L. High efficiency alcohol tolerant *Saccharomyces* isolates of *Phoenix dactylifera* for bioconversion of sugarcane juice into bioethanol. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 2009. 68(5): p. 401-405.
47. Gnansounou E. Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: Current situation and perspectives. *Bioresource Technology*, 2010. 101(13): p. 4842-4850.
48. UE. Proposal for a directive of the european parliament and of the council amending Directive 98/70/EC relating to the quality of petrol and diesel fuels and amending Directive 2009/28/EC on the promotion of the use of energy from renewable sources. 2012.
49. Romaní A, Garrote G, Ballesteros I, Ballesteros M. Second generation bioethanol from steam exploded *Eucalyptus globulus* wood. *Fuel*, 2013. 111: p. 66-74.
50. Martín M, Grossmann IE. Energy optimization of bioethanol production via hydrolysis of switchgrass. *AIChE Journal*, 2012. 58(5): p. 1538-1549.
51. Ferreira S, Gil N, Queiroz JA, Duarte AP, Domingues FC. Bioethanol from the Portuguese forest residue *Pterospartum tridentatum* - An evaluation of pretreatment strategy for enzymatic saccharification and sugars fermentation. *Bioresource Technology*, 2010. 101(20): p. 7797-7803.

52. Singhania RR, Saini JK, Saini R, Adsul M, Mathur A, Gupta R, Tuli DK. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. *Bioresource Technology*, 2014. 169: p. 490-495.
53. Wi SG, Choi IS, Kim KH, Kim HM, Bae HJ. Bioethanol production from rice straw by popping pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, 2013. 6(1)
54. Zhu ZS, Zhu MJ, Xu WX, Liang L. Production of bioethanol from sugarcane bagasse using $\text{NH}_4\text{OH-H}_2\text{O}_2$ pretreatment and simultaneous saccharification and co-fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012. 17(2): p. 316-325.
55. Li A, Antizar-Ladislao B, Khraisheh M. Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bio-ethanol production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2007. 30(3): p. 189-196.
56. Xavier AMRB, Correia MF, Pereira SR, Evtuguin DV. Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor. *Bioresource Technology*, 2010. 101(8): p. 2755-2761.
57. Fernandes DLA, Pereira SR, Serafim LS, Evtuguin DV, Xavier AMRB. Second generation bioethanol from lignocellulosics: Processing of hardwood sulphite spent liquor. In: Lima MAP, Natalense APP, editores. *Bioethanol*. Croatia: InTech; 2012.
58. Gonzalez R, Daystar J, Jett M, Treasure T, Jameel H, Venditti R, Phillips R. Economics of cellulosic ethanol production in a thermochemical pathway for softwood, hardwood, corn stover and switchgrass. *Fuel Processing Technology*, 2012. 94(1): p. 113-122.
59. Daystar JS, Venditti RA, Gonzalez R, Jameel H, Jett M, Reeb CW. Impacts of feedstock composition on alcohol yields and greenhouse gas emissions from the NREL thermochemical ethanol conversion process. *BioResources*, 2013. 8(4): p. 5261-5278.
60. Limayem A, Ricke SC. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2012. 38(4): p. 449-467.
61. Martín-Sampedro R, Eugenio ME, García JC, Lopez F, Villar JC, Diaz MJ. Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*. *Biomass and Bioenergy*, 2012. 42: p. 97-106.
62. Zhao C, Ding W, Chen F, Cheng C, Shao Q. Effects of compositional changes of AFEX-treated and H-AFEX-treated corn stover on enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*, 2014. 155: p. 34-40.
63. Franco H, Mendonça RT, Marcato PD, Durán N, Freer J, Baeza J. Diluted acid pretreatment of *Pinus radiata* for bioethanol production using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* IR2-9 in a simultaneous saccharification and fermentation process. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2011. 56(4): p. 901-906.

64. Zhang L, You T, Yang H, Xu F. Enhanced fermentability of poplar by combination of alkaline peroxide pretreatment and semi-simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 2014. 164: p. 292-298.
65. Araque E, Parra C, Freer J, Contreras D, Rodríguez J, Mendonça R, Baeza J. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008. 43(2): p. 214-219.
66. López-Abelairas M, Álvarez Pallín M, Salvachúa D, Lú-Chau T, Martínez MJ, Lema JM. Optimisation of the biological pretreatment of wheat straw with white-rot fungi for ethanol production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013. 36(9): p. 1251-1260.
67. Nilvebrant NO, Persson P, Reimann A, De Sousa F, Gorton L, Jönsson LJ. Limits for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 2003. 107(1-3): p. 615-628.
68. Heinonen J, Tamminen A, Uusitalo J, Sainio T. Ethanol production from wood via concentrated acid hydrolysis, chromatographic separation, and fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2012. 87(5): p. 689-696.
69. Romaní A, Garrote G, Alonso JL, Parajó JC. Experimental assessment on the enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated *Eucalyptus globulus* wood. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2010. 49(10): p. 4653-4663.
70. Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 2000. 74(1): p. 25-33.
71. Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 2000. 74(1): p. 17-24.
72. Pereira SR, Ivanuša T, Evtuguin DV, Serafim LS, Xavier AMRB. Biological treatment of eucalypt spent sulphite liquors: A way to boost the production of second generation bioethanol. *Bioresource Technology*, 2012. 103(1): p. 131-135.
73. Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998. 49(6): p. 691-697.
74. Dehkhoda A, Brandberg T, Taherzadeh MJ. Comparison of vacuum and high pressure evaporated wood hydrolyzate for ethanol production by repeated fed-batch using flocculating *Saccharomyces cerevisiae*. *BioResources*, 2009. 4(1): p. 309-320.
75. Canilha L, De Almeida E Silva JB, Solenzal AIN. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. *Process Biochemistry*, 2004. 39(12): p. 1909-1912.

76. Alriksson B, Sjöde A, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Optimal conditions for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006. 130(1-3): p. 599-611.
77. Fernandes DLA, Silva CM, Xavier AMRB, Evtuguin DV. Fractionation of sulphite spent liquor for biochemical processing using ion exchange resins. *Journal of Biotechnology*, 2012. 162(4): p. 415-421.
78. Pinilla L, Torres R, Ortiz C. Bioethanol production in batch mode by a native strain of *Zymomonas mobilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011. 27(11): p. 2521-2528.
79. Kuhad RC, Gupta R, Khasa YP, Singh A, Zhang YHP. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011. 15(9): p. 4950-4962.
80. Scordia D, Cosentino SL, Lee JW, Jeffries TW. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. *Biomass and Bioenergy*, 2012. 39: p. 296-305.
81. Sun WL, Tao WY. Comparison of cell growth and ethanol productivity on different pretreatment of rice straw hemicellulose hydrolysate by using *Candida shehatae* CICC 1766. *African Journal of Microbiology Research*, 2010. 4(11): p. 1105-1109.
82. Moya AJ, Bravo V, Mateo S, Sánchez S. Fermentation of acid hydrolysates from olive-tree pruning debris by *Pachysolen tannophilus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2008. 31(6): p. 611-617.
83. Sánchez Nogué V, Karhumaa K. Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. *Biotechnology Letters*, 2015. 37(4): p. 761-772.
84. Sindhu R, Kuttiraja M, Binod P, Sukumaran RK, Pandey A. Bioethanol production from dilute acid pretreated Indian bamboo variety (*Dendrocalamus* sp.) by separate hydrolysis and fermentation. *Industrial Crops and Products*, 2014. 52: p. 169-176.
85. Muñoz C, Baeza J, Freer J, Mendonça RT. Bioethanol production from tension and opposite wood of *Eucalyptus globulus* using organosolv pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011. 38(11): p. 1861-1866.
86. Van Zyl WH, Lynd LR, Den Haan R, McBride JE. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2007. 108: p. 205-235.
87. Parisutham V, Kim TH, Lee SK. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresource Technology*, 2014. 161: p. 431-440.

88. Rom A, Strommer M, Friedl A. Comparison of sweepgas and vacuum membrane distillation as in-situ separation of ethanol from aqueous solutions. *Chemical Engineering Transactions*, 2014. 39(Special Issue): p. 985-990.
89. Ikegami T, Kitamoto D, Negishi H, Haraya K, Matsuda H, Nitnai Y, Koura N, Sano T, Yanagishita H. Drastic improvement of bioethanol recovery using a pervaporation separation technique employing a silicone rubber-coated silicalite membrane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2003. 78(9): p. 1006-1010.
90. Chen H, Li G. An industrial level system with nonisothermal simultaneous solid state saccharification, fermentation and separation for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 2013. 74: p. 121-126.
91. Habaki H, Tabata O, Kawasaki J, Egashira R. Extraction equilibrium of ethanol for bioethanol production-solvent selection and liquid-liquid equilibrium measurement. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 2010. 53(3): p. 135-143.
92. Tang B, Bi W, Row KH. Using poly([1-vinyl-3-hexylimidazolium] [bis(trifluoromethylsulfonyl)imide]) to adsorb bio-ethanol from a *Chamaecyparis obtuse* leaves fermentation broth. *Bioresource Technology*, 2013. 137: p. 25-32.
93. FitzPatrick M, Champagne P, Cunningham MF, Whitney RA. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, 2010. 101(23): p. 8915-8922.
94. Yuan TQ, Xu F, Sun RC. Role of lignin in a biorefinery: separation characterization and valorization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2013. 88(3): p. 346-352.
95. Harner NK, Wen X, Bajwa PK, Austin GD, Ho CY, Habash MB, Trevors JT, Lee H. Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2015. 42(1): p. 1-20.
96. Nigam JN. Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001. 26(3): p. 145-150.
97. Kurtzman CP, Suzuki M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*, 2010. 51(1): p. 2-14.
98. Jeffries TW, Grigoriev IV, Grimwood J, Laplaza JM, Aerts A, Salamov A, Schmutz J, Lindquist E, Dehal P, Shapiro H, Jin YS, Passoth V, Richardson PM. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*, 2007. 25(3): p. 319-326.

99. Agbogbo FK, Coward-Kelly G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*, 2008. 30(9): p. 1515-1524.
100. du Preez JC, Bosch M, Prior BA. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1986. 23(3-4): p. 228-233.
101. Nigam JN. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *Journal of Biotechnology*, 2002. 97(2): p. 107-116.
102. Leandro MJ, Fonseca C, Gonçalves P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Research*, 2009. 9(4): p. 511-525.
103. Agbogbo FK, Coward-Kelly G, Torry-Smith M, Wenger KS. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry*, 2006. 41(11): p. 2333-2336.
104. Sánchez S, Bravo V, Castro E, Moya AJ, Camacho F. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2002. 77(6): p. 641-648.
105. Slininger PJ, Thompson SR, Weber S, Liu ZL, Moon J. Repression of xylose-specific enzymes by ethanol in *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* and utility of repitching xylose-grown populations to eliminate diauxic lag. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011. 108(8): p. 1801-1815.
106. Hahn-Hägerdal B, Jeppsson H, Skoog K, Prior BA. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, 1994. 16(11): p. 933-943.
107. Verduyn C, van Kleef R, Frank J, Schreuder H, Van Dijken JP, Scheffers WA. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochemical Journal*, 1985. 226(3): p. 669-677.
108. Yablochkova EN, Bolotnikova OI, Mikhailova NP, Nemova NN, Ginak AI. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. *Microbiology*, 2003. 72(4): p. 414-417.
109. Wang JF, Wei DQ, Lin Y, Wang YH, Du HL, Li YX, Chou KC. Insights from modeling the 3D structure of NAD(P)H-dependent D-xylose reductase of *Pichia stipitis* and its binding interactions with NAD and NADP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007. 359(2): p. 323-329.
110. Shi NQ, Cruz J, Sherman F, Jeffries TW. SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*. *Yeast*, 2002. 19(14): p. 1203-1220.

111. Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hähn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007. 82(4): p. 340-349.
112. Bellido C, Bolado S, Coca M, Lucas S, González-Benito G, García-Cubero MT. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, 2011. 102(23): p. 10868-10874.
113. van Zyl C, Prior BA, du Preez JC. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1991. 13(1): p. 82-86.
114. Díaz MJ, Ruiz E, Romero I, Cara C, Moya M, Castro E. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009. 25(5): p. 891-899.
115. Nigam JN. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*, 2001. 87(1): p. 17-27.
116. Ma M, Wang X, Zhang X, Zhao X. Alcohol dehydrogenases from *Scheffersomyces stipitis* involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013. 97(18): p. 8411-8425.
117. Zhu J, Yang J, Zhu Y, Zhang L, Yong Q, Xu Y, Li X, Yu S. Cause analysis of the effects of acid-catalyzed steam-exploded corn stover prehydrolyzate on ethanol fermentation by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014. 37(11): p. 2215-2222.
118. Ejim L, Mirza IA, Capone C, Nazi I, Jenkins S, Chee GL, Berghuis AM, Wright GD. New phenolic inhibitors of yeast homoserine dehydrogenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2004. 12(14): p. 3825-3830.
119. Winkler JD, Kao KC. Recent advances in the evolutionary engineering of industrial biocatalysts. *Genomics*, 2014. 106(6): p. 406-411.
120. Bajwa PK, Shireen T, D'Aoust F, Pinel D, Martin VJJ, Trevors JT, Lee H. Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009. 104(5): p. 892-900.
121. Pereira SR, Sánchez i Nogué V, Frazão CJR, Serafim LS, Gorwa-Grauslund MF, Xavier AMRB. Adaptation of *Scheffersomyces stipitis* to hardwood spent sulfite liquor by evolutionary engineering. *Biotechnology for Biofuels*, 2015. 8(1): p. 1-8.
122. Nigam JN. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. *Journal of Applied Microbiology*, 2001. 90(2): p. 208-215.

123. Stoutenburg RM, Perrotta JA, Nakas JP. Overcoming inhibitors in a hemicellulosic hydrolysate: improving fermentability by feedstock detoxification and adaptation of *Pichia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011. 38(12): p. 1939-1945.
124. Huang CF, Lin TH, Guo GL, Hwang WS. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, 2009. 100(17): p. 3914-3920.
125. Yang X, Zhang S, Zuo Z, Men X, Tian S. Ethanol production from the enzymatic hydrolysis of non-detoxified steam-exploded corn stalk. *Bioresource Technology*, 2011. 102(17): p. 7840-7844.
126. Lloyd D, Kristensen B, Degn H. Glycolysis and respiration in yeasts. The Pasteur effect studied by mass spectrometry. *Biochemical Journal*, 1983. 212(3): p. 749-754.
127. Papini M, Nookaew I, Uhlén M, Nielsen J. *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2012. 11
128. Passoth V, Zimmermann M, Klinner U. Peculiarities of the regulation of fermentation and respiration in the Crabtree-negative, xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996. 57-58(1): p. 201-212.
129. Guebel DV, Cordenons A, Nudel BC, Giulietti AM. Influence of oxygen transfer rate and media composition on fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Journal of Industrial Microbiology*, 1991. 7(4): p. 287-291.
130. Taniguchi M, Tohma T, Itaya T, Fujii M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997. 83(4): p. 364-370.
131. Laplace JM, Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*: oxygen requirement as a key factor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991. 36(2): p. 158-162.
132. Furlan SA, Bouilloud P, De Castro HF. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochemistry*, 1994. 29(8): p. 657-662.
133. Bellido C, González-Benito G, Coca M, Lucas S, García-Cubero MT. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, 2013. 133: p. 51-58.
134. Lin TH, Huang CF, Guo GL, Hwang WS, Huang SL. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, 2012. 116: p. 314-319.

135. Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Fermentation of D-xylose, D-glucose, L-arabinose mixture by *Pichia stipitis*: Effect of the oxygen transfer rate on fermentation performance. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989. 34(3): p. 398-402.
136. Skoog K, Hahn-Hagerdal B. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990. 56(11): p. 3389-3394.
137. Ligthelm ME, Prior BA, du Preez JC. The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1988. 28(1): p. 63-68.
138. Skoog K, Jeppsson H, Hahn-Hägerdal B. The effect of oxygenation on glucose fermentation with *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1992. 34-35(1): p. 369-375.
139. Silva JPA, Mussatto SI, Roberto IC. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010. 162(5): p. 1306-1315.
140. du Preez JC, van Driessel B, Prior BA. D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotechnology Letters*, 1989. 11(2): p. 131-136.
141. Skoog K, Hahn-Hagerdal B, Degn H, Jacobsen JP, Jacobsen HS. Ethanol reassimilation and ethanol tolerance in *Pichia stipitis* CBS 6054 as studied by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992. 58(8): p. 2552-2558.
142. Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Larsson CU, Gorwa-Grauslund M, Görgens J, van Zyl WH. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial Cell Factories*, 2005. 4(31)
143. Portugal-Nunes D, Sánchez i Nogué V, Pereira SR, Craveiro SC, Calado AJ, Xavier AMRB. Effect of cell immobilization and pH on *Scheffersomyces stipitis* growth and fermentation capacity in rich and inhibitory media. *Bioresources and Bioprocessing*, 2015. 2(1): p. 1-9.
144. Wise WS. The measurement of the aeration of culture media. *Journal of General Microbiology*, 1951. 5(1): p. 167-177.
145. Lee TY, Kim MD, Kim KY, Park K, Ryu YW, Seo JH. A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2000. 5(1): p. 27-31.
146. Marques AP, Evtuguin DV, Magina S, Amado FML, Prates A. Chemical composition of spent liquors from acidic magnesium-based sulphite pulping of *Eucalyptus globulus*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 2009. 29(4): p. 322-336.

147. Liu T, Zou W, Liu L, Chen J. A constraint-based model of *Scheffersomyces stipitis* for improved ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 2012. 5
148. Silva JPA, Mussatto SI, Roberto IC, Teixeira JA. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2011. 28(1): p. 151-156.
149. Su YK, Willis LB, Jeffries TW. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015. 112(3): p. 457-469.
150. Slininger PJ, Branstrator LE, Bothast RJ, Okos MR, Ladisch MR. Growth, death, and oxygen uptake kinetics of *Pichia stipitis* on xylose. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991. 37(10): p. 973-980.
151. du Preez JC, Bosch M, Prior BA. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, 1986. 8(6): p. 360-364.
152. Klinner U, Fluthgraf S, Freese S, Passoth V. Aerobic induction of respiro-fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005. 67(2): p. 247-253.
153. Mahler GF, Guebel DV. Influence of magnesium concentration on growth, ethanol and xylitol production by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnology Letters*, 1994. 16(4): p. 407-412.
154. Mahler G, Nudel C. Effect of magnesium ions on fermentative and respiratory functions in *Pichia stipitis* under oxygen-restricted growth. *Microbiological Research*, 2000. 155(1): p. 31-35.